

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN Y CICLO
CELULAR EN HEMATOLOGÍA**

**Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado y título de
Especialidad en Hematología**

ESTEBAN JARA SEGURA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

Dedicatoria

A mi familia y amigos, el motor que me impulsa a aprovechar cada momento y seguir mis sueños

Agradecimientos

A mi equipo de trabajo, por la ayuda constante y permitir que la investigación sea posible

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	II
Agradecimientos	II
Resumen	V
Lista de Tablas	VI
Lista de Figura	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Introducción	1
Capítulo 1. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo	3
Fase S	4
Índice de ADN	4
Detergentes de lisis	5
Tinciones de células fijadas	6
Tinciones supravitales	7
Tinciones de tejidos embebidos en parafina	9
Análisis multiparamétricos	9
Análisis de proliferación	11
Análisis de ciclinas	13
Limitaciones técnicas de la citometría de flujo	14
Capítulo 2. Aplicaciones en hematología del análisis de ciclo celular y proliferación	16
Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA)	17
Gamapatías monoclonales	18
Síndromes linfoproliferativos	20
Capítulo 3. Análisis de proliferación celular por DRAQ5 y ki67	22
Metodología	22
Preparación de muestras para cuantificación de ADN y proliferación celular	22
Estrategia de Análisis	23
Resultados	25
Poblaciones normales	25
Poblaciones linfoides en SLPC-B	27
Discusión	29

Poblaciones normales en médula ósea	29
Proliferación en SLPC-B	32
Diferencias entre S+G2M y Ki67+	35
Conclusiones	36
Referencias bibliográficas	37

Resumen

El ciclo celular es el proceso mediante el cual el material genético de una célula se duplica y se distribuye de formas iguales en células nuevas. Las alteraciones en su regulación pueden generar proliferación anormal, característica propia de las neoplasias. Por medio de la citometría de flujo es posible evaluar el ciclo celular y la proliferación bajo múltiples marcadores y procedimientos y así entender el comportamiento tanto de células sanas como patológicas. En el presente trabajo se explican las principales aplicaciones del estudio del ciclo celular por CF y su utilidad en enfermedades hematológicas. Además, se evaluó el uso del marcador ki67 por medio de esta herramienta en poblaciones hematopoyéticas sanas y en células linfoides aberrantes en síndromes linfoproliferativos y se comprobó su aplicabilidad por CF.

Lista de Tablas

Tabla 1. Principales ciclinas en humano, sus funciones y momento de mayor concentración. Página 14

Tabla 2. Cantidad de muestras según diagnóstico inmunofenotípico. Página 22

Tabla 3. Porcentajes de S+G2M y ki67+ en las principales subpoblaciones celulares en MO. Página 26

Tabla 4. Porcentajes de proliferación de distintos síndromes linfoproliferativos tipo B, inmunofenotipos, diagnósticos, tipos de muestra y datos moleculares adicionales. Página 28.

Lista de Figura

Figura 1. Relación por CF entre cantidad de ADN y fase del ciclo celular. Página 4

Figura 2. Estrategia de análisis con DRAQ5. Página 24

Figura 3. Estrategia de análisis con ki67. Página 25

Figura 4. Diagrama de cajas de porcentajes de principales subpoblaciones celulares en médula ósea en fase S+G2M determinado por medio de DRAQ5. Página 26

Figura 5. Diagrama de cajas de porcentajes de positividad por ki67 de principales subpoblaciones celulares en médula ósea determinados por CF. Página 27

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribunocleico

AO: naranja de acridina

APC: aloficocianina

ARN: ácido riboxinulceico

BrdU: Bromodeoxiuridina

CDK: quinasa dependiente de ciclinas

CDK: quinasa dependiente de cilcina

CF: citometría de flujo

CV: coeficiente de variación

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Db: doble banda

DI: índice de ADN

DRAQ5: deep red-fluorescing bisalkylaminoanthraquinone número 5

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMR: enfermedad mínima residual

ErdU: 5 etinil-2'-deoxiuridina

FISH: hibridación in situ fluorescente

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: dispersión frontal

HPC: célula progenitora hematopoyética

HSC: células madre hematopoyéticas

LLA-B: Leucemia Linfoide Aguda tipo B

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica B

LMA M3: Leucemia mieloide aguda tipo Promielocítica

LNH DLCL: linfoma no hodgkin difuso de células grandes

LNH: linfoma no Hodgkin

LNH: Linfoma No Hodgkin

LNH-T: Linfoma No Hodgkin tipo T

M: mitosis
MM: mieloma múltiple
MO: médula ósea
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PCPI: porcentaje de células en proliferación
PE: ficoeritrina
PI: yoduro de propidio
PY: pyronyn y
SC: células stem
SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico
SMD: Síndrome Mielodisplásico
SP: sangre periférica
SSC: dispersión lateral
UV: luz ultravioleta



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-61-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 27 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Esteban Alonso Jara Segura carné # B13388, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Hematología. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Melissa Granados Zamora MSc., quien preside y lectora, Berta Valverde Rojas Esp., lectora y Evan Jensen Gamboa Esp., tutor.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado "Aplicación de la citometría de flujo para análisis de proliferación y ciclo celular en hematología"

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [X] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 19:04 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Melissa Granados Zamora, MSc., Evan Jensen Gamboa, Esp., Berta Valverde Rojas, Esp., and Esteban Alonso Jara Segura, Estudiante.

Observaciones: Mención honorífica

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita. Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones.



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Esteban Jara Segura, con cédula de identidad 402210682, en mi condición de autor del TFG titulado Aplicación de la citometría de flujo para análisis de proliferación y ciclo celular en hematología

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, padece como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

El ciclo celular es el proceso mediante el cual el material genético de una célula se duplica y se distribuye de formas iguales en células nuevas. En la mayoría de las células consta de dos fases conocidas como mitosis (M) e interfase. La primera consiste en la división nuclear y generación de dos células hijas, mientras que la interfase se define por los procesos que acontecen entre dos mitosis. La interfase se subdivide en tres fases denominadas G1, S y G2. La etapa G1 contempla el crecimiento y preparación previa a la replicación de ADN, la fase S se define como el proceso de replicación, mientras que la fase G2 es el proceso de preparación que antecede la mitosis. Algunas células antes de entrar en fase S, logran mantener un estado no proliferativo o quiescente conocido como fase G0 y no llegan a la etapa de mitosis (Vermeulen et al., 2003).

Este programa celular se encuentra coordinado principalmente por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas. Las CDKs y sus respectivas ciclinas forman complejos y se encargan de fosforilar diversas proteínas con el fin de permitir el progreso entre etapas del ciclo y/o la replicación del ADN. La síntesis o degradación de ciclinas, así como de inhibidores o fosfatasas encargadas de desfosforilar las CDKs mantienen un estricto control en el ciclo celular (Dai et al., 2019).

En la hematopoyesis, los procesos de diferenciación, crecimiento y apoptosis dependen de CDKs y ciclinas, de inhibidores de ciclinas, factores de transcripción, citoquinas, microARNs y de la matriz extracelular. Gracias a estas complejas regulaciones, las células madre hematopoyéticas (HSC) autorrenovables ciclan a bajas tasas de proliferación, mientras que las células progenitoras con compromiso de línea poseen altas tasas de proliferación y las células totalmente diferenciadas no se duplican, sino que permanecen en fase G0 (Hao et al., 2016).

Alteraciones en reguladores del ciclo celular pueden provocar el desarrollo o progresión del cáncer, pues proveen el ambiente necesario para una proliferación descontrolada, característica que define las neoplasias (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas modificaciones pueden deberse a deleciones o mutaciones de genes supresores de

tumores u oncogenes fundamentales para el correcto desarrollo del ciclo celular o por cambios en la expresión genética inducido por la epigenética (Dai et al., 2019).

Es por lo explicado anteriormente, que el análisis del ciclo celular permite entender el comportamiento de células normales y patológicas, su diferenciación, crecimiento, senescencia y apoptosis (Kim & Sederstrom, 2015)

La citometría de flujo (CF) es una herramienta poderosa que permite analizar grandes cantidades de células, identificarlas por subpoblaciones mediante múltiples marcadores y al mismo tiempo analizar el contenido de ADN y/o etapa del ciclo celular en que se encuentra cada célula de una muestra en estudio. Su uso ha ido en aumento y la comprensión de esta tecnología es imprescindible a nivel clínico (Matarraz et al, 2011).

Capítulo 1. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo

La forma tradicional y más sencilla para evaluar el ciclo celular en el área de la CF es mediante la cuantificación de ADN, lo cual se define como análisis de una variable (Darzynkiewicz et al., 2004). La cantidad de tinción que adquiere cada célula correlaciona con la cantidad de ADN y esta a su vez es determinada por medio del citómetro de flujo gracias a la intensidad de fluorescencia (Darzynkiewicz et al., 2001).

El contenido de ADN se relaciona con la madurez celular, debido a que según su cantidad es posible determinar en qué fase del ciclo celular se encuentra cada célula analizada. En la fase G1 y/o G0 el material nucleico equivale a una unidad, en la fase G2 y/o M el contenido genético se encuentra duplicado por lo que se identifica como dos unidades, mientras que aquellas células en fase S contienen entre una y dos unidades. Las células en apoptosis también se logran identificar debido a que el ADN se encuentra fragmentado, por lo que poseen menor contenido que aquellas en fase G0/G1 (Telford et al., 1992).

Estas mediciones se valoran usualmente mediante histogramas gracias a los softwares de análisis incluidos con los citómetros de flujo modernos. La cantidad de células en cada población se estima determinando el área bajo la curva (Marshall & Rutledge, 2000). En una población normal diploide se observa un pico predominante que equivale a las células en fase G0/G1, un pico de menor tamaño con el doble de ADN que corresponde a la subpoblación en fase G2/M y entre ambas aquellas que se encuentran en fase de síntesis. Las células en apoptosis se ubican con menor intensidad en la zona conocida como “sub G1” (ver figura 1). Un histograma de ADN de buena calidad debe contar con la mínima cantidad de detritos celulares y un pico G1 simétrico con un coeficiente de variación (CV) lo menor posible (Krueger & Wilson, 2011).

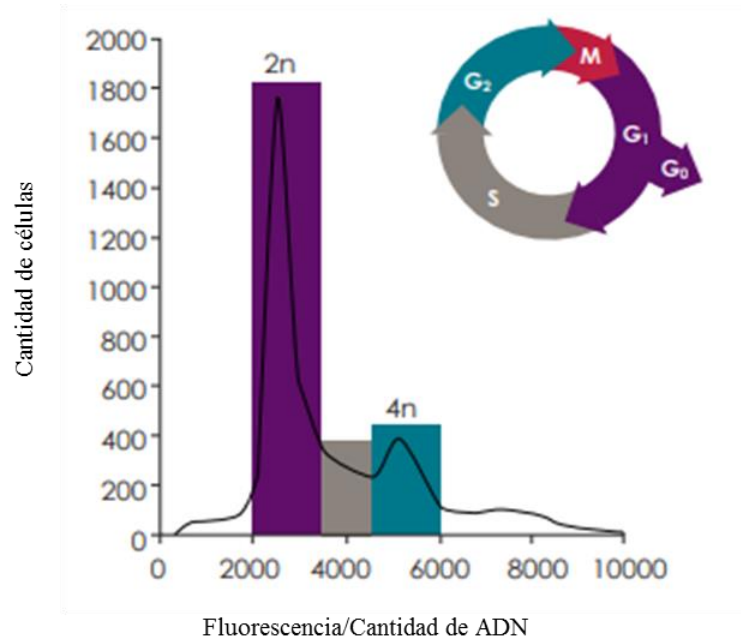


Figura 1. Relación por CF entre cantidad de ADN y fase del ciclo celular. Modificado de Chan *et al* 2011.

Fase S

El porcentaje de células estimado en fase S posee relevancia adicional ya que se utiliza como indicador de proliferación. Esta fracción celular correlaciona clínicamente con neoplasias con mayor agresividad y con peor pronóstico (Marshall & Rutledge, 2000).

Índice de ADN

Mediante el análisis de ADN por CF se puede determinar si existe anormalidad en la cantidad de ácido nucleico de cada célula, es decir si existe aneuploidía. La aneuploidía se define como la ganancia o pérdida de cromosomas en una célula, lo cual es indicador de neoplasia (Molina *et al.*, 2021). Se determina gracias al cálculo del índice de ADN (DI, por sus siglas en inglés), que consiste en el ratio entre la media (o moda) del contenido de ADN fase G₀/G₁ de la población de estudio comparada con la de una población de referencia. Esta población control debe ser normal y diploide e idealmente del mismo tejido a analizar y del mismo individuo del que se recolectó la muestra. Cabe destacar que células no humanas o esferas no biológicas que se pueden utilizar como referencia se recomiendan únicamente para la calibración del instrumento y no para la determinación del DI (Hiddemann *et al.*, 1984; Nunez, 2001).

$$DI = \frac{\text{Fase}_{G_1}^{G_0} \text{ de población de estudio}}{\text{Fase}_{G_1}^{G_0} \text{ de población de referencia}}$$

El DI igual a 1.0 representa una población de estudio diploide, mientras que valores mayores o menores reflejan hiperdiploidía e hipodiploidía respectivamente (Nunez, 2001).

Para las tinciones de ADN se han utilizado múltiples reactivos a lo largo del tiempo. El primero en emplearse por medio de CF se conoce como tinción de Feulgen, su fundamento es la hidrólisis ácida del ADN, lo cual produce aldehídos que posteriormente son teñidos por medio del reactivo de Schiff (Chieco & Derenzini, 1999). Por medio de esta tinción se reportaron los primeros histogramas de las fases del ciclo celular realizados por esta herramienta, sin embargo, el procesamiento de muestras es tedioso y comparado con las técnicas actuales se considera lento (Alderton, 1969; Darzynkiewicz et al., 2004).

Hoy, existen diferentes protocolos para el análisis del contenido de ADN, estos varían según sean células fijadas o tratadas con detergentes, vivas o embebidas en parafina.

Detergentes de lisis

Debido a que no todas las tinciones de ADN son permeables a la membrana celular se deben realizar procesamientos celulares para que los reactivos puedan ingresar a la célula, específicamente al núcleo. Para esto se utilizan detergentes o fijadores. Los detergentes son capaces de debilitar las interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas que se dan entre proteínas y lípidos en la membrana celular y así desintegrarla. Los detergentes no iónicos son los más frecuentemente utilizados en los protocolos de CF, ya que estos causan menores daños a proteínas y enzimas que los demás, entre estos se encuentran Tritón X y Tween (Islam et al., 2017).

Este proceso también permite aislar el núcleo del resto de componentes celulares, lo cual produce una mejor tinción del ADN debido a que se reduce la tinción inespecífica de organelas, se evita la autofluorescencia de ciertos componentes citoplasmáticos y se excluye del análisis el ADN extranuclear como el mitocondrial, mejorando así la calidad

del histograma y reflejando de mejor manera la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula o el DI (Darzynkiewicz et al., 2017).

Se debe tener en cuenta que estos métodos no permiten la preservación a lo largo del tiempo en comparación con las fijaciones. Además, se puede omitir la detección de células mitóticas, pues al estar la membrana celular disgregada y al no existir membrana nuclear durante la fase mitótica que contenga los ácidos nucleicos se puede perder los cromosomas durante el procesamiento o reconocerse los agregados cromosómicos como células con menor cantidad de ADN, o sea como células en apoptosis. Por otro lado, las células en apoptosis al lisarse pueden liberar fragmentos de ADN y como cada fragmento es reconocido como una célula, la región sub G1 puede sobreestimarse. Por lo tanto, en ensayos donde se busque evaluar rigurosamente la apoptosis celular no es recomendable el uso de detergentes (Darzynkiewicz, 2011; Darzynkiewicz & Huang, 2004).

Distintos métodos basados en el uso de detergentes se han empleado a lo largo de la historia, siendo el principal el “método de Vindelov” el cual utiliza detergentes y tripsina, eliminando restos proteicos y fuentes de ADN diferentes al nuclear. Este procedimiento se utiliza ampliamente gracias a que la calidad del análisis permite histogramas con CV considerablemente reducidos (Krueger & Wilson, 2011; Vindeløv & Christensen, 1990).

Tinciones de células fijadas

La fijación celular se emplea habitualmente con el fin de preservar las muestras biológicas ya sea para transporte de las mismas o conservarlas a lo largo del tiempo. Al fijarse pueden almacenarse por meses o incluso años y por medio de este proceso se logra permeabilizar las membranas celulares de tal modo que las tinciones penetren y se unan al ADN (Darzynkiewicz & Huang, 2004; Davies & Allen, 2007).

Existen dos métodos de fijación: a través de alcoholes o a través de aldehídos. Para determinación del contenido de ADN o análisis del ciclo celular se prefiere el uso de alcoholes, generalmente etanol a 70%, ya que desnaturalizan proteínas nucleares y permiten un mejor acceso del reactivo al ADN y por lo tanto una mejor tinción. En contraste, los aldehídos, cuyo principal ejemplo es el paraformaldehído, fijan las células formando enlaces covalentes entre proteínas y por lo tanto mantienen una posición fija de las moléculas. Lo anterior dificulta el paso de los fluorocromos y sólo se recomienda en

situaciones donde es necesario conservar la localización de las proteínas (como al analizar proteínas fluorescentes) (Darzynkiewicz et al., 2017).

Entre los principales reactivos utilizados para teñir células fijadas se encuentran el yoduro de propidio (PI) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El primero se caracteriza por teñir tanto ADN como ARN, por lo que los procedimientos de empleo sugieren la incubación de los tejidos por evaluar con ARNasas, lo cual provoca un proceso más laborioso. El PI es excitado con luz azul celeste a 488 nm, lo cual permite que la mayoría de citómetros de flujo puedan utilizarlo, pues para esto se requiere un láser de argón que es una de las fuentes de luz de uso común (Darzynkiewicz et al., 2017).

El DAPI comparado con PI posee la ventaja que es más específico para el ADN, lo cual se refleja en menores CV en la medición del contenido de ADN de poblaciones en fase G1. No obstante, DAPI requiere para su excitación luz ultravioleta (UV), lo cual no está disponible en todos los citómetros y este tipo de luz puede generar mayor autofluorescencia en algunas poblaciones, por lo que para estas se prefiere el uso de PI (Darzynkiewicz & Huang, 2004).

Tinciones supravitales

Para aquellas células sin fijar, que usualmente están vivas, se deben utilizar fluorocromos que se unen estequiométricamente al ADN y que al mismo tiempo son membrana-permeables gracias a que no tienen carga, conocidos como tinciones supravitales (Darzynkiewicz, 2011).

Las evaluaciones en células vivas se utilizan por lo general para separación de poblaciones por medio de “cell sorting” en donde las células se clasifican según contenido de ADN con el fin de cultivarlas y analizar tasas de crecimiento, apoptosis, sensibilidad de drogas, aumentar las distintas poblaciones, entre otras. Se debe señalar que estas tinciones inducen señalización por daños en el ADN como por ejemplo activación de ATM, p53 o Chk2, lo cual puede provocar activación de vías regulatorias del ciclo celular y/o apoptóticas (Darzynkiewicz et al., 2017a).

El reactivo más utilizado para tinción de células vivas es el Hoechst 33258, este posee como ventaja que fluoresce a 460 nm por lo que puede utilizarse en conjunto con otras tinciones fluorescentes o proteínas que emiten dentro del rango visible, sin embargo,

para su excitación es necesario una fuente de luz UV (Martin et al., 2005). Esto posee especial importancia porque puede provocar fotólisis de ADN y no todos los citómetros de flujo poseen esta tipo de fuente óptica (Darzynkiewicz, 2011).

Además, la intensidad de fluorescencia de Hoechst 33342 varía según la célula analizada. Esto sucede en gran parte por las bombas de eflujo en ciertas poblaciones celulares que brinda la capacidad de expulsar la tinción parcialmente (Darzynkiewicz et al., 2004). Gracias a esta propiedad se han descrito métodos de separación de células madre o células stem (SC), ya que estas poseen alto contenido de bombas de eflujo de la familia de transportadores dependientes de ATP (“ATP-binding cassette transporters”) en la membrana celular y por lo tanto se tiñen débilmente con Hoechst 33342. La baja fluorescencia de esta población ha permitido separar fácilmente las células madre y debido al patrón que forman en los diagramas de puntos, separadas de la mayoría de la población, se les conoce como “side population” (SP) (Margaret, 2005).

Los protocolos de separación de células por medio de este fluorocromo han permitido estudiar ampliamente las células madre de tejidos sanos e incluso las células madre cancerígenas, poblaciones análogas a las SC con capacidad de iniciar tumores, autorrenovables, resistentes a quimioterapia y con potencial metastásico tanto en malignidades hematopoyéticas como en tumores sólidos (Shimoda et al., 2018).

Ante la variabilidad de intensidad en la fluorescencia por bombas de eflujo, es posible añadir inhibidores de estos transportadores en conjunto con Hoechst 33342 y así evaluar de manera correcta las fases del ciclo celular, entre estos se encuentra DiOC5, tinción para medir potencial de membrana, y Verapamil, un bloqueador específico de canales de calcio (Darzynkiewicz, 2011; Margaret, 2005; Shimoda et al., 2018).

Otro reactivo supravital es el DRAQ5, cuyas siglas vienen del inglés “**d**eep **r**ed-**f**luorescing **b**isalkylamino**a**nthraquinone” número 5 y como su nombre lo dice es una molécula perteneciente a la familia de las antraquinonas, como los antibióticos antraciclina, que se intercalan en el ADN y son capaces de atravesar la membrana celular. DRAQ5 fluoresce en la región de luz visible correspondiente al rojo (más de 665 nm de longitud de onda) (Smith et al., 2000).

El DRAQ5 tiene como máxima excitación una longitud de onda de 640 nm, pero el rango se puede ampliar hasta 489 nm, lo cual permite el uso de fuentes de luz visible en el citómetro, es decir a diferencia de Hoechst 33342 no es necesario luz UV y se evitan todos los costos y daños celulares de este reactivo. Además debido a sus características de excitación y emisión es posible utilizarla con otras proteínas fluorescentes (Martin et al., 2005).

Tinciones de tejidos embebidos en parafina

En algunos casos, los tejidos se conservan en parafina con tal de realizar análisis retrospectivos del contenido de ADN. Al ser preservados porciones de tejidos completos es posible discernir qué porción de la muestra desea procesarse, permitiendo descartar células necróticas o secciones que no son de interés y pueden perturbar el análisis. Sin embargo, al ser tratadas por lo general con formaldehído previo a ser embebidas con parafina tienden a perder precisión de análisis, esto debido a los enlaces covalentes que produce este reactivo que impiden el ingreso de los fluorocromos al ADN. La evaluación también puede ser afectada por los cortes del bloque de tejido que podría afectar el núcleo o provocar acumulación de restos celulares. Para este tipo de tejido se ha demostrado que el DAPI es el colorante con mayor efectividad (Darzynkiewicz et al., 2017).

Análisis multiparamétricos

El análisis multiparamétrico se define como la identificación de compartimentos o fases del ciclo celular y/o cuantificación de moléculas relacionadas con las fases del ciclo celular (Jacobberger et al., 2018). Al determinar el contenido de ADN celular únicamente por medio del análisis de una sola variable, no es posible discernir entre las fases G0 y G1 o entre las fases G2 y M por lo que se han utilizado distintos marcadores y protocolos para estudiar más a fondo el ciclo celular (Darzynkiewicz et al., 2004).

El fluorocromo conocido como naranja de acridina (AO) posee la capacidad de teñir tanto ADN de doble banda (db) como ARN de banda única con la particularidad de emitir distinta fluorescencia según el tipo de ácido nucleico. Para su uso se debe permeabilizar las células con detergentes no iónicos, reducir el pH para disociar las histonas del ADN y desnaturalizar todas las formas de ARN de doble banda en banda única. Para esta desnaturalización se utilizan agentes quelantes como por ejemplo EDTA o citrato ya que estos rompen las interacciones ARN-proteína y permiten que los ribosomas liberen la

mayoría de ARN, posteriormente el AO se encarga de desnaturalizar el ARN db y teñirlo. De esta forma el AO se intercala en el ADN db fluoresciendo a 530 nm (verde) y se une al ARN por medio de atracción electrostática con una emisión de 630 nm (rojo). Debe contemplarse que para lograr esta tinción diferencial se debe utilizar concentraciones exactas de AO para no desnaturalizar el ADN db nativo (Darzynkiewicz, 1990a; El-Naggar, 2004a).

Mediante esta técnica se logra clasificar las distintas fases del ciclo celular mencionadas anteriormente por el contenido de ADN de cada grupo, pero además gracias a la determinación del contenido de ARN se puede distinguir entre células G0 caracterizadas por su escasa actividad y por lo tanto identificadas por el bajo contenido de ARN que poseen. Bajo este mismo principio también es posible identificar entre subfases de G1, siendo la fase G1a aquella más prematura por su menor contenido de ARN, mientras que la fase G1b al ser la más cercana a iniciar la fase de síntesis posee mayor cantidad de ARN (Darzynkiewicz, 1990b; El-Naggar, 2004b).

A través de AO también es posible diferenciar la fase G2 y la fase de mitosis. A diferencia de la cuantificación de ARN, para este proceso en primera instancia se debe eliminar el ARN por medio de ARNasas y posteriormente se desnaturaliza el ADN por medio de calor o acidez. Al incubar las células ante estas condiciones, las poblaciones en mitosis y en fase G0 con cromatina condensada, se desnaturalizan más fácilmente, convirtiéndose así en ADN de banda única por lo que el AO se une a estas y fluoresce en rojo, mientras que las células en fase G1, S y G2 mantienen su forma de doble banda y por lo tanto fluorescen en verde. De esta forma es posible distinguir las poblaciones en las cinco fases del ciclo celular (Darzynkiewicz et al., 2004).

A pesar de la versatilidad del AO, su amplio espectro de fluorescencia se traslapa con los fluorocromos habitualmente utilizados para identificación de otros antígenos celulares y los procesos de desnaturalización ácida pueden alterar antígenos de interés para análisis multiparamétricos. Es por esto que se han implementado reactivos que permitan reconocer las fases del ciclo celular y simultáneamente utilizar anticuerpos marcados con algún fluorocromo, entre estos se encuentra la combinación de Hoechst 33342 y pyronin y (PY). El Hoechst 33342 como se mencionó anteriormente se intercala

en el ADN mientras que PY se intercala tanto en ADN db como en ARN db. El contenido de ARN en su mayoría es de doble banda, al igual que el ADN, por lo que al agregar en primera instancia el Hoechst 33342 el PY teñirá sólo el ARN celular. De esta forma, gracias a las diferencias de ARN y ADN (fundamento también empleado al usar AO) es posible identificar las cinco fases del ciclo celular (Kim & Sederstrom, 2015; Shapiro, 2000a).

El Hoechst 33342 requiere de luz UV para su excitación y emite cerca de 450 nm y el PY absorbe luz visible en aproximadamente 550 nm y emite a 575 nm, gracias a esto es posible utilizar otros fluorocromos como FITC, PE, entre otros y así identificar marcadores proteicos simultáneamente, es decir permite el análisis multiparamétrico. Cabe destacar que para ejecutar esta doble tinción es necesario que el citómetro esté equipado con dos fuentes de luz diferentes, pero permite agregar otros anticuerpos conjugados (Kim & Sederstrom, 2015; Shapiro, 2000b).

Análisis de proliferación

Existen múltiples análisis multiparamétricos útiles para evaluar la proliferación celular. Entre estos se encuentra el uso de Bromodeoxiuridina (BrdU). BrdU es un análogo de la base nitrogenada timidina, componente fundamental del ADN, por lo que al exponer tejidos o cultivos a esta molécula las células que se encuentran ingresando a fase de síntesis lo incorporarán. Posteriormente se añaden anticuerpos anti BrdU conjugados con algún fluorocromo y se analiza la intensidad de fluorescencia en conjunto con la detección del contenido de ADN utilizando PI u otro marcador. El análisis conjunto de BrdU y ADN permite cuantificar e identificar las células que sintetizan activamente ADN y correlacionarla con la fase del ciclo celular en que se encuentra y además es posible utilizar otros anticuerpos y ampliar la identificación fenotípica (Rothausler & Baumgarth, 2007a).

La BrdU posee como ventajas que no tiene propiedades radioactivas como otros marcadores que se integran al ADN permitiendo el ahorro en equipamientos y en tiempo de procesamientos, es estable una vez acoplado a la célula por lo que puede analizarse durante meses y se puede utilizar en ensayos *in vivo* con el fin de evaluar la replicación en modelos animales. Sin embargo, requiere de métodos de fijación y permeabilización

para lograr llegar al núcleo y la desnaturalización del ADN para que este pase a ser de banda única y así ser reconocido por medio de anticuerpos anti-BrdU (Rothausler & Baumgarth, 2007b).

Debido a estas limitaciones de BrdU se han empleado nuevos análogos como 5 etinil-2'-deoxiuridina (ErdU). Este también es un análogo de la timidina que se incorpora en células en fase S, pero posee como ventajas que no necesita permeabilización gracias a su tamaño y para su detección por CF no es necesario el uso de anticuerpo, por lo tanto, no se debe desnaturalizar el ADN, sino que requiere de un proceso químico con cobre para que se genere fluorescencia. El proceso, en comparación con BrdU es más rápido e igualmente permite analizar concomitantemente otros marcadores celulares (Cavanagh et al., 2011; Kim & Sederstrom, 2015)

Otra manera de analizar la proliferación celular es mediante la detección de proteínas intracelulares. Una de ellas es por medio del antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA, es un cofactor de la polimerasa de ADN que en conjunto con otras moléculas permite que la replicación sea un proceso continuo y además se ha reportado su papel en la reparación de ADN. La concentración de esta proteína empieza a aumentarse en la fase G1 tardía, pero su pico de concentración se da en fase de síntesis. La detección de PCNA por medio de anticuerpos monoclonales permite identificar por lo tanto aquellas células en replicación (Larsen et al., 2001).

El antígeno Ki67 es otro marcador de proliferación caracterizado por encontrarse en células ciclando, es decir en aquellas que se encuentran en fase G1, S, G2 y en mitosis, pero no en aquellas quiescentes o en fase G0 (Vignon et al., 2013). La función de Ki67 fue por años desconocida, pero hoy se sabe que, en conjunto con otras moléculas, evita que los cromosomas formen agregados durante la mitosis (X. Sun & Kaufman, 2018). Para su análisis es necesario el uso de anticuerpos monoclonales que reconozcan el antígeno y se debe permeabilizar y fijar las células (Y. Sun et al., 2016). Cabe destacar que este marcador ha adquirido relevancia pronóstica gracias a que células tumorales agresivas lo expresan en mayor proporción que aquellas sanas o con mejor pronóstico, esto se ha observado en cáncer de seno, de tejidos blandos, pulmones, próstata, cérvix, sistema nervioso central y en linfomas (Li et al., 2015).

Análisis de ciclinas

Las ciclinas, como se mencionó anteriormente se encargan junto a las quinasas dependientes de ciclinas de fosforilar proteínas que permiten que las células avancen de fase a fase en el ciclo celular. Las células sanas en crecimiento expresan ciclinas de forma discontinua, ya que sus concentraciones varían periódicamente según la fase del ciclo celular (Darzynkiewicz et al., 1996; Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

Las principales ciclinas en humanos son las D, B, A y E. La ciclina D se caracteriza por aumentar su expresión ante la estimulación mitogénica de células G0 o en respuesta de factores de crecimiento. En efecto se ha reportado que las células en quiescencia no expresan las ciclinas D, B, A ni E y por lo tanto la aparición de ciclina D marca la transición de células G0 a la entrada al ciclo o a la fase G1. La ciclina D forma un complejo con las CDK4 y CDK6 e inactivan a la proteína de la retinoblastoma, liberando así los factores de transcripción E2F, lo cual permite la expresión de genes necesarios para la transición a fase S. Al mismo tiempo se inicia la expresión de la ciclina E, acumulándose hasta alcanzar su pico de concentración justo durante la transición G1/S (Darzynkiewicz et al., 1996; Toprak et al., 2012).

Posteriormente, en la fase S la ciclina A interactúa con la CDK1 permitiendo a las células avanzar a fase G2 y con CDK2 hasta alcanzar la fase M, específicamente en la profase. Esta ciclina llega a su pico máximo de concentración al final de la fase G2, degradándose a inicios de la mitosis. La ciclina B1 empieza a acumularse justo al inicio de la fase G2 llegando a su máximo nivel justo antes de la anafase y se encarga de activar la CDKI formando el factor promotor de maduración que permite la mitosis (Darzynkiewicz et al., 1996; Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004; Toprak et al., 2012).

Con base en las variaciones en la concentración de las ciclinas y el análisis simultáneo del contenido de ADN, es posible distinguir entre todas las fases clásicas del ciclo celular. Además, por medio de las ciclinas A y B1 junto a marcadores de mitosis es posible identificar las etapas mitóticas profase, prometafase, metafase, anafase y mitosis tardía (ver tabla 1). Entre los marcadores de mitosis más comunes se encuentra la fosfohistona H3 y MPM2. Estos son epítomos fosforilados y su relevancia se basa en que la condensación de la cromatina en la mitosis requiere de procesos de fosforilación por lo

tanto la presencia de ambos correlaciona con la transición entre G2 y M y se mantienen hasta la división celular. Incluso se ha identificado una subpoblación llamada “G1 recién nacida” en la cual las células no expresan las ciclinas A y B, pero aún mantienen leve expresión de los marcadores mitóticos (Darzynkiewicz et al., 1996; Gloria Juan et al., 2001).

Tabla 1. Principales ciclinas en humano, sus funciones y momento de mayor concentración. Modificado de Darzynkiewicz et al., 1996.

Ciclina	Función	Pico de expresión
D1	Fosforilación de proteína del retinoblastoma, compromiso hacia la fase S	G1 temprana
E	Inicio de fase S	Transición G1/S
A	Progresos a la fase G2 y M	Durante G2/M
B1	Entrada a la fase M	G2/M tardía

Aparte de reconocer las distintas fases del ciclo celular, se puede identificar expresión de ciclinas aberrantes. lo cual se define como expresión no programada. Se da en células tumorales o en células sanas con su ciclo celular alterado, por ejemplo, en células en fase G1 se ha encontrado la ciclina B1 y esto demuestra alteraciones debido a que esta ciclina es específica de las fases G2/M o la persistencia de ciclina D1 a lo largo de todo el ciclo celular como indicadora de neoplasia (G. Juan et al., 1996).

Para el análisis de las ciclinas se debe permeabilizar y fijar las células. La literatura actual recomienda el uso de etanol al 70% y formaldehído al 1%. Además, se debe contemplar que los marcadores de mitosis y el estudio y comprensión de las ciclinas en general avanza diariamente (Jacobberger et al., 2008, 2018).

Limitaciones técnicas de la citometría de flujo

Durante el análisis de ADN el citómetro de flujo puede detectar dos células en fase G0/G1 como un único evento con contenido genético semejante a una célula en fase G2/M, lo cual se conoce como un doblete. Los dobletes y/o agregados celulares pueden generar así una súper estimación incorrecta de la población G2/M. Es por esto que los citómetros de flujo actuales poseen un módulo de discriminación de dobletes, que permite

separar los dobletes celulares debido a que poseen mayor ancho de pulso que aquellas G2/M y además forman un clúster diferente en el diagrama de puntos (Nunez, 2001).

Capítulo 2. Aplicaciones en hematología del análisis de ciclo celular y proliferación

La hematopoyesis es el proceso de producción de células sanguíneas en MO (MO). Fisiológicamente HSCs se dividen simétricamente para renovarse a sí mismas o asimétricamente para generar las células madre progenitoras (HPC) que dan origen a las distintas líneas celulares y células maduras que se encuentran en sangre periférica (Ashman, 2012).

Las HSC permanecen quiescentes en MO a pesar de su alto potencial proliferativo. Mientras que las HPC son las que poseen una mayor tasa proliferativa para mantener los niveles necesarios de células maduras (Ashman, 2012).

Alteraciones en el ciclo celular pueden promover el desarrollo y/o progresión de células tumorales en lugar de las HSCs o HPCs necesarias para la hematopoyesis normal. Deleciones o mutaciones que llevan a pérdida o ganancia de la función en genes supresores de tumores, desregulan el ciclo celular y generan proliferación descontrolada. También existen modificaciones epigenéticas que pueden afectar los genes y llevar a la reprogramación del ciclo celular y generar así malignidad (Dai et al., 2019).

Las alteraciones en genes de ciclinas o CDKs o la delección/silenciamiento epigenético de genes inhibidores de CDK son comunes en casi todos los tipos de tumores, incluidos los hematológicos (Dai et al., 2019).

A través de la CF, es posible determinar la ganancia o pérdida de cromosomas, es decir la aneuploidía, la cual se encuentra en 90% de tumores sólidos y en 60% de malignidades hematológicas (Molina et al., 2021). Asimismo, la proliferación descontrolada característica en estas patologías puede determinarse a través de la cuantificación del ADN, de marcadores de proliferación como ki67 o de la síntesis de ADN (uso de BrdU) (Ashman, 2012).

Además, la CF permite analizar muestras de MO, sangre periférica o masas tumorales.

A continuación, las principales aplicaciones de esta herramienta en enfermedades hematológicas:

Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA)

Las leucemias linfoblásticas agudas representan la mayoría de las enfermedades hematológicas en poblaciones pediátricas. Se pueden clasificar según la cantidad de cromosomas, definiéndose como hiperdiploides aquellas con ganancias de cromosomas e hipodiploides como las que tienen menos de 44 cromosomas. Las leucemias hiperdiploides se subclasifican en baja hiperdiploidía (47-50 cromosomas), alta hiperdiploidía (51-67 cromosomas) y cercanas a tri o tetradiploidía (más de 67 cromosomas). Se encuentran blastos con alta hiperdiploidía en un 25% de los pacientes pediátricos, en 5% de pacientes adultos y se considera la alteración genética más frecuente en este tipo de leucemias. Además, se asocia a un pronóstico favorable y una supervivencia promedio mayor al 90% (Molina et al., 2021; Roberts, 2018).

En el caso de leucemias hipodiploides, se describen dos subtipos: aquellos con baja hipodiploidía (31-39 cromosomas) que se asocian a un muy mal pronóstico pues correlacionan con mutaciones en TP53 y deleciones en IKZF2, se encuentra principalmente en adultos y aquellos cercanos a la haploidía (24-30 cromosomas) es más infrecuente, se identifica en aproximadamente 3% de los pacientes con LLA y se asocia a un pronóstico intermedio (Roberts, 2018).

Tradicionalmente la detección de estas anormalidades se da a través de técnicas citogenéticas como el cariotipo convencional y la hibridación in situ fluorescente (FISH). Para el cariotipo es necesario muestras frescas que puedan ser cultivables y es necesario personal experto para lograr el análisis. El FISH posee gran utilidad; sin embargo, no es capaz de detectar clones con baja hipodiploidía o cercanos a la haploidía y los costos son más elevados (Gupta et al., 2019; Look et al., 1985).

Por medio de la determinación del DI por CF es posible clasificar según la ploidía de los casos de LLA de una manera rápida, automatizada y eficiente. Se ha demostrado que existe una alta correlación entre la CF y los análisis citogenéticos en LLA (Rachieru-Sourisseau et al., 2010). Además, la CF posee la ventaja que a través del uso de distintos marcadores inmunofenotípicos es posible aislar la población tumoral del resto de poblaciones medulares normales y así se logra identificar de manera correcta las

propiedades de la población de interés, especialmente en aquellas poblaciones clonales pequeñas (Tembhare et al., 2016).

Los umbrales para determinar a partir de cual DI se define hiper o hipodiploidía varían según estudio. Se ha establecido desde los años 80 que un DI mayor a 1.16 define hiperdiploidía y correlaciona con un mejor pronóstico (Look et al., 1985). Actualmente se utiliza este umbral, pero se ha descrito que poblaciones con DI entre 1.10 y 1.15 se asocian con baja hiperdiploidía y brindan información pronóstica de relevancia, pues poseen peor pronóstico. En el caso de las hipodiploidías, Gupta *et al* describen el uso de DI entre 0.55-0.69 para definir casos cercanos a la haploidía y DI entre 0.70-0.88 para casos de baja hipodiploidía.

Existen casos de LLA en que se identifican clones hiperdiploides que en realidad se trata de poblaciones hipodiploides en procesos de replicación, lo que se conoce como hipodiploidía enmascarada. Estos casos llevan a un reto diagnóstico por lo que se sugiere complementar el análisis por CF con la citogenética y pruebas moleculares (Carroll et al., 2019; Yu et al., 2020).

En estudios de enfermedad mínima residual (EMR) también se ha empleado la cuantificación de ADN nuclear en conjunto con análisis inmunofenotípicos para reconocer clones aberrantes que se encuentran embebidos en mezclas celulares complejas. En LLA el clon aberrante puede ser de difícil identificación ante la presencia de células linfoides inmaduras o hematogonias, por lo que la detección de aneuploidía puede mejorar la sensibilidad. Se han propuesto métodos con PI y DRAQ5, mediante este último se ha logrado detectar 1 célula aneuploide entre 10^4 células normales (Swerts et al., 2007).

Gamapatías monoclonales

El mieloma múltiple (MM), enfermedad caracterizada por la presencia de células plasmáticas monoclonales aberrantes se ha subclasificado en dos grupos según estudios genéticos. Un primer grupo que se define por hiperdiploidía causada por trisomía de cromosomas impares. Se encuentra en más de la mitad de los casos y posee un pronóstico favorable. Los pacientes restantes (aproximadamente un 40%) pertenecen al segundo grupo compuesto por casos con traslocaciones tales como t(4;14) y t(4;16), que

proporcionan al paciente un peor pronóstico y se asocian por lo general con cariotipos hipodiploides (Barilà et al., 2020).

El método habitual para evaluar la hiperdiploidía es el FISH y para esta técnica se utilizan múltiples sondas para cromosomas 3,5,7,9,11,15,17 y 21. Sin embargo a pesar de su valor pronóstico, sus costos son elevados. Es por esto que la CF ha sido propuesta para evaluar el contenido de ADN (Sidana et al., 2019).

Para determinar la ploidía en gamapatías monoclonales, Sidana y otros proponen determinar el DI definiendo las células plasmáticas aberrantes a través de marcadores como CD38 y CD138 y diferenciarlas de las plasmáticas normales mediante la expresión diferencial de CD38, CD19, CD45, kappa y lambda. Posteriormente con un marcador de ADN se determina el DI utilizando las células plasmáticas normales como población de referencia. Esta determinación se recomienda utilizar en conjunto con el FISH, para aumentar la información pronóstica, posibilidad terapéutica y reducir costos.

En el estudio de EMR también se ha sugerido utilizar el contenido de ADN en conjunto con distintos marcadores para una mayor sensibilidad y por su aplicabilidad (en más de 95% de los casos) (Almeida et al., 1999).

Pérez-Persona y otros han demostrado que un mayor porcentaje de células plasmáticas aneuploide en gamapatías monoclonales de significado incierto se asocia con mayor riesgo de progresión a mieloma múltiple (Pérez-Persona et al., 2007).

Además, en gamapatías monoclonales se ha utilizado el porcentaje de células en proliferación (PCPI) para evaluación pronóstica. Históricamente se determinaba utilizando bromodeoxiuridina y su análisis inmunohistoquímico, pero se ha reemplazado este reactivo por el uso de marcadores de ADN y el análisis por CF. El PCPI se determina calculando el porcentaje de células plasmáticas aberrantes en fase S y su porcentaje se ha asociado con el estado proliferativo de las células patológicas pues se encuentran activamente sintetizado ADN (Paiva et al., 2012).

El PCPI se ha establecido como un factor independiente de progresión en mielomas latentes (Aljama et al., 2018). En mieloma múltiple se ha demostrado que un PCPI mayor a 1% conlleva a una inferior supervivencia libre de progresión y una sobrevida promedio.

Incluso se ha observado que pacientes con PCPI mayor a 15% se asocia a una proliferación extremadamente aumentada y por lo tanto una señal de muy mal pronóstico. También se ha demostrado que aquellos pacientes en recaída tienen mayor índices de proliferación comparado con el análisis al diagnóstico (Paiva et al., 2012).

En amiloidosis se ha utilizado el PCPI de igual manera como factor pronóstico, pero además se ha demostrado que su elevación se relaciona con mayor afección cardíaca. También se ha demostrado que pacientes con más proliferación poseen mayor beneficio de terapia quimioterapéutica pre-trasplante que aquellos con bajos PCPI; sin embargo, son necesarios más estudios por CF que corroboren estos datos de manera más robusta (Sidiqi et al., 2018).

Se debe destacar que la CF no permite identificar poblaciones pseudodiploides, donde la cantidad de ADN correlaciona con la población diploide, pero existen rearrreglos cromosómicos, como por ejemplo las traslocaciones que definen otros grupos pronósticos en LLA, MM, entre otras enfermedades.

Síndromes linfoproliferativos

La determinación de aneuploidía por CF ha adquirido importancia en el análisis de linfomas T. Existen casos, como en el síndrome de Sézary por ejemplo, donde casos con inmunofenotipos aberrantes o anormalidades genéticas mínimas que no permiten un estudio de EMR eficiente, la ploidía puede agregar información relevante para identificar recaídas. Se ha reportado también que la ploidía se asocia con mayor riesgo de transformación a linfomas de células grandes (Wang et al., 2004).

En los síndromes linfoproliferativos de tipo B (SLPC-B) se ha demostrado que el porcentaje de células en proliferación refleja el comportamiento biológico y clínico de las patologías. Por ejemplo los linfomas No Hodgkin (LNH) de alto grado poseen tasas de alta proliferación asociado a la activación constitutiva de proto oncogenes como C-MYC (Marcondes et al., 2018; Quijano et al., 2008).

Para la determinación del porcentaje de proliferación en LNH se han utilizado anticuerpos anti PCNA, MIB-1 y ki67 a través de inmunohistoquímica. Este último marcador ha sido ampliamente utilizado para diferenciar entre LNH indolentes de LNH agresivos y como factor pronóstico independiente. Broyde y otros proponen utilizar un

umbral de 45% de positividad para diferenciar entre LNH indolentes y agresivos. En linfomas difusos de células grandes B la positividad mayor a 70% por inmunohistoquímica puede distinguir a pacientes con un peor pronóstico si se utiliza en combinación con otros factores como el índice pronóstico internacional y la presencia de masas tipo bulky.

Un claro ejemplo es la alta expresión del ki67 en linfomas tipo Burkitt que se reporta como cercano al 100% y pertenecen al subgrupo de linfomas de alto grado con peor pronóstico (Broyde et al., 2009; Naresh et al., 2011).

Diversos estudios por CF han corroborado que esta herramienta es igualmente capaz de discernir entre grados de linfoma según agresividad e intensidad de expresión de ki67 (Marcondes et al., 2018).

Además, se ha asociado en linfomas de bajo grado, como la leucemia linfocítica crónica, pueden existir subpoblaciones con mayor actividad y asociadas con un comportamiento más agresivo. Estas células patológicas asociadas a la expresión de marcadores conocidos como de mal pronóstico como CD38 expresan con mayor intensidad ki67, por lo que este marcador puede asociarse de igual manera con comportamientos adversos y brindar información pronóstica relevante (Damle et al., 2007).

A pesar de la aplicabilidad y la información diagnóstica y pronóstica que puede brindar la CF es necesaria la estandarización de metodologías para el estudio del ciclo celular y análisis de proliferación, así como nuevos estudios que aporten mayor información y entendimiento de las poblaciones hematopoyéticas sanas y patológicas. Es por esto que el presente trabajo profundizará en el análisis de ki67 y DRAQ5 para evaluar la proliferación de tejidos sanguíneos.

Capítulo 3. Análisis de proliferación celular por DRAQ5 y ki67

Metodología

Se procesaron 28 muestras de MO y 10 muestras de sangre periférica previamente analizadas inmunofenotípicamente y recién diagnosticadas. Todas las muestras contenidas en tubos con EDTA. Fueron obtenidas entre enero y mayo 2021. Se utilizaron 12 muestras sin presencia de infiltración neoplásica y 26 con diagnóstico patológico (ver tabla 2). En promedio la edad de los pacientes fue de 67 ± 15 años. Se descartaron dos muestras normales por falla en la compensación del DRAQ5. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica y las muestras se anonimizaron de tal forma que no fue necesario consentimiento informado.

Tabla 2. Cantidad de muestras según diagnóstico inmunofenotípico.

Diagnóstico	Cantidad de muestras
SMD	3
LLC	4
LNH	10
LMA M3	1
MM	4
LLA-B	2
LNH T	1
Normales	12

SMD: Síndrome Mielodisplásico, LLC: Leucemia Linfocítica Crónica B, LNH: Linfoma No Hodgkin, LMA M3: Leucemia mieloide aguda tipo Promielocítica (M3 según clasificación FAB), MM: Mieloma Múltiple, LLA-B: Leucemia Linfocítica Aguda tipo B, LNH-T: Linfoma No Hodgkin tipo T.

Preparación de muestras para cuantificación de ADN y proliferación celular

Se prepararon dos tubos para análisis por CF. El primer tubo se marcó con CD45 FITC, CD34 PE y DRAQ5. El segundo tubo se marcó CD45 FITC, ki67 PE y CD117 APC. En cada muestra se utilizó en primera instancia el método de lisis, marcando en primer lugar con los anticuerpos CD45 FITC y CD34 PE o CD117 APC respectivamente. Posterior a este marcaje al tubo 1 se le agregó DRAQ5 y se configuró el citómetro de flujo para el análisis de DRAQ5 en la tercera fluorescencia. El tubo 2 posterior al marcaje se le agregó una solución permeabilizante y otra fijadora, finalmente se le añadió anti ki67

FITC y se incubó en refrigeración siguiendo estrictamente las recomendaciones de la casa comercial. Cada tubo se analizó por medio del citómetro de flujo FACs Calibur.

Estrategia de Análisis

Para el análisis de datos se utilizó el programa INFINICYT V.2.0 (Cytognos). Se determinaron las principales poblaciones celulares por medio del marcador panleucocitario CD45 y la dispersión lateral (SSC) en conjunto con la gráfica FSC/SSC. Los linfocitos se seleccionaron en la región con CD45+ de alta expresión y SSC reducido. Las células eritroides se seleccionaron mediante la baja o nula expresión de CD45 y SSC reducido. La población granulocítica se seleccionó como aquella con expresión de CD45 intermedia y SSC reducido. Los monocitos se identificaron con SSC intermedia y CD45 entre intermedia y alta. Los eosinófilos como los eventos con SSC alta y autofluorescencia. Todas las subpoblaciones se redefinieron según el gráfico FSC/SSC y la ubicación esperada.

Mediante el uso adicional de diagramas CD34/SSC y CD117/SSC se seleccionaron las células CD34+ o CD117+ respectivamente y se identificaron como células precursoras al evaluar conjuntamente la baja expresión de CD45.

El porcentaje de proliferación de cada población, que incluye las células en fase S y G2/M (%S+G2M), se identificaron como aquellas que tuviesen mayor intensidad de expresión de DRAQ5 que las identificadas en el pico G0/G1 (ver figura 2).

Se identificaron las poblaciones ki67+ según cada subpoblación (ver imagen 3). Basado en la literatura se sugiere que la positividad de ki67 puede variar según subpoblación analizada, pues cada tipo de célula prolifera de manera diferente (Y. Sun et al., 2016).

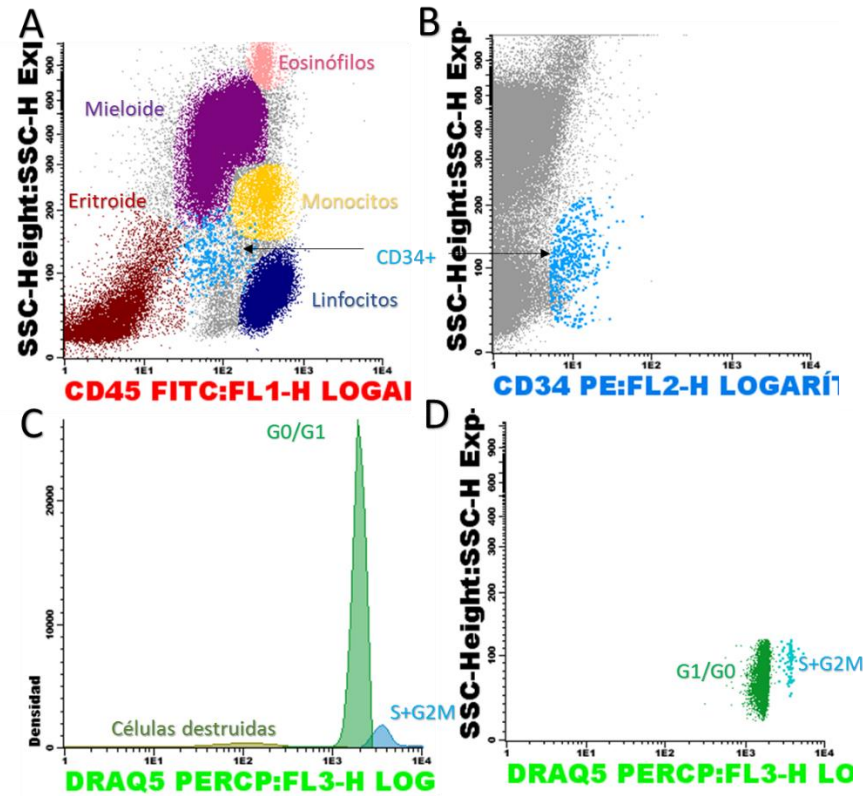


Figura 2. Estrategia de análisis con DRAQ5. **2A** Definición de cada subpoblación según CD45. **2B**. Selección de células CD34. **2C**. Diagrama de análisis de toda la población según contenido de ADN, determinado por DRAQ5. **2D**. Diagrama de puntos en identificación de células en fase G0/G1 y fase S+G2M en la población linfocitaria.

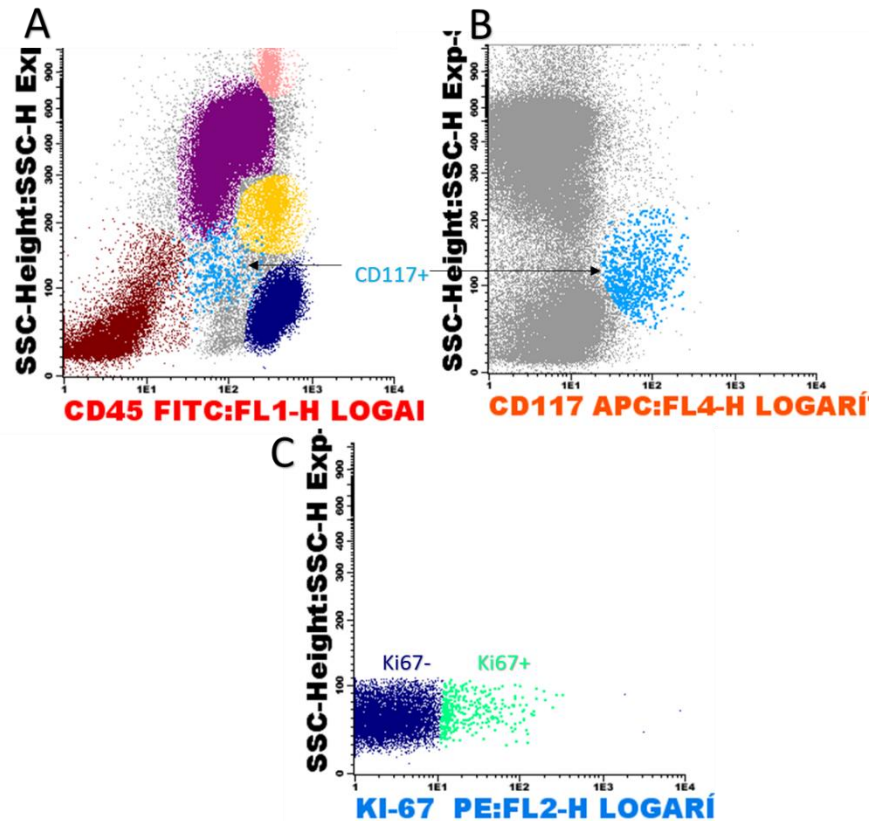


Figura 3. Estrategia de análisis con ki67. **3A** Definición de cada subpoblación según CD45. **3B**. Selección de células CD117 positivas. **3C**. Análisis de población linfocitaria según expresión de ki67.

Resultados

Poblaciones normales

El porcentaje de proliferación de las subpoblaciones normales determinado por medio de contenido de ADN y positividad por ki67 se muestran en la tabla 3. Todas las muestras analizadas se identificaron como diploides.

Las células eritroides mostraron el mayor porcentaje células en fase S+G2M ($25,36 \pm 9.39\%$), las células precursoras CD34+ en fase S+G2M se identificaron como la segunda población con mayor proliferación ($15.36 \pm 7.09\%$) y la población monocítica y granulocítica mostraron proliferación intermedia ($6.12 \pm 1.23\%$ y $12.48 \pm 7.61\%$ respectivamente), mientras que los linfocitos presentaron la menor proliferación ($1.37 \pm 0.48\%$) (figura 4).

Mediante ki67 se determinó que la población de precursores CD117+ mostró mayor positividad que el resto de subpoblaciones ($31.97 \pm 14.41\%$), los precursores eritroides

presentaron un porcentaje de positividad de 16.00 ± 6.53 . En las poblaciones granulocíticas y monocíticas se determinó una expresión de ki67 similar $7.33 \pm 3.14\%$ y $7.52 \pm 2.86\%$ respectivamente. Los linfocitos mostraron un porcentaje de $3.62 \pm 3.18\%$ (figura 5).

Tabla 3. Porcentajes de S+G2M y ki67+ en las principales subpoblaciones celulares en MO.

Población	Eritroblastos		Mieloide		Monocitos		Linfocitos		Precursores	
	%S+G2M	%ki67+	%S+G2M	%ki67+	%S+G2M	%ki67+	%S+G2M	%ki67+	%S+G2M	%ki67+
Promedio (%)	25,36	16,00	12,48	7,33	6,12	7,52	1,37	3,62	15,36	31,97
SD (%)	9,39	6,53	7,61	3,14	1,23	2,86	0,48	3,18	7,09	14,41

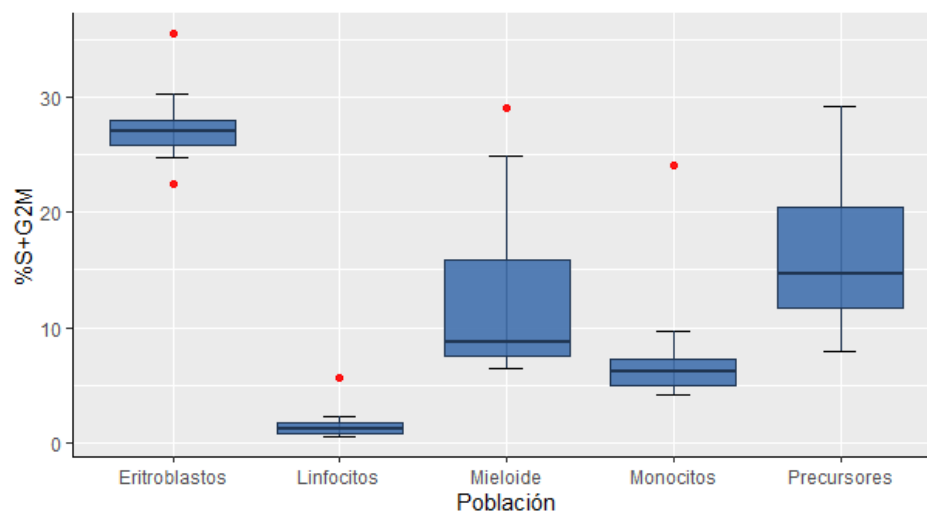


Figura 4. Diagrama de cajas de porcentajes de principales subpoblaciones celulares en médula ósea en fase S+G2M determinado por medio de DRAQ5.

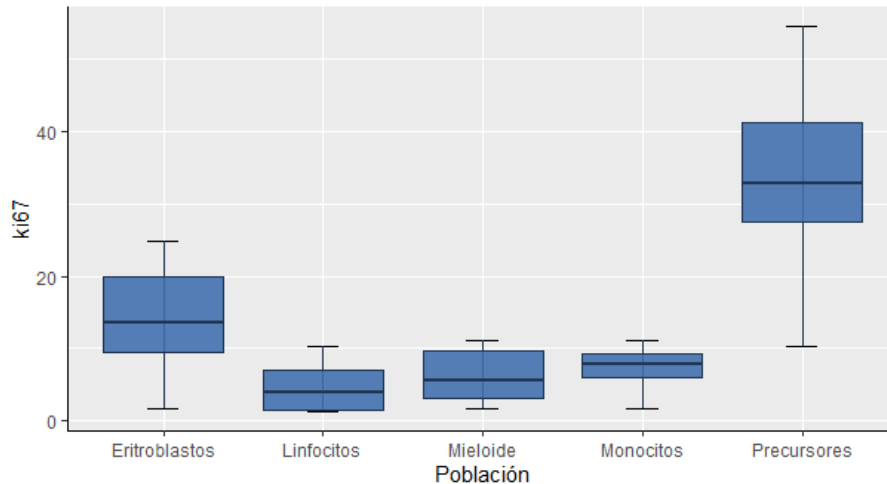


Figura 5. Diagrama de cajas de porcentajes de positividad por ki67 de principales subpoblaciones celulares en médula ósea determinados por CF.

Poblaciones linfoides en SLPC-B

Se trabajó con 14 muestras con linfocitos clonales aberrantes. Se distribuyeron como 4 LLC, 4 posibles linfomas no Hodgkin de manto (dos de ellos no pudieron ser corroborados por la ausencia de la traslocación 11;14, en otros dos casos no se obtuvo la información diagnóstica en nuestro centro), 2 linfomas difusos de células grandes, un linfoma no Hodgkin no clasificado, un linfoma no Hodgkin CD5+, un linfoma no Hodgkin folicular y un linfoma no Hodgkin marginal o MALT.

Se determinaron los porcentajes de proliferación según contenido de ADN de la fase S+G2M y de positividad por ki67. Se incluyó los datos moleculares disponibles, así como el inmunofenotipo de cada muestra (ver tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de proliferación de distintos síndromes linfoproliferativos tipo B, inmunofenotipos, diagnósticos, tipos de muestra y datos moleculares adicionales. SP: Sangre periférica, MO: médula ósea, LLC: Leucemia Linfocítica Crónica, LNH: Linfoma No Hodgkin, MALT: tejido linfoide asociado a mucosa, DLCL: linfoma difuso de células grandes.

Caso	Muestra	S+G2M (%)	Ki67 + (%)	Diagnóstico	Inmunofenotipo	Otros
5	SP	2,83	22,25	LLC	CD19+/CD45+/KAPPA-/LAMBDA+/CD10-/CD5+d/CD23+d/CD20+/ROR1-/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200+d/IgM-	IGHV FR1 No Mutado, TP53 normal, ATM Normal
17	SP	0,67	7,63	LLC	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23+/CD20+/ROR1-/CD43-/CD38+/CD49d+/CD200+/IgM-/CD79b-/-	IGHV FR1 Mutado, TP53 normal, ATM Normal
23	SP	1,4	0,63	LLC	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23+d/CD20+d/ROR1-/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200+	ND
38	SP	4,36	3,66	LLC	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23+/CD20+d/ROR1+d/CD43-/CD38-/CD49d-/CD200+/IgM+d/CD79b+d	ND
8	MO	1,4	3,84	LNH Manto	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23-/CD20+/ROR1-/CD43-/CD38+/CD49d-/CD200-/IgM+/HLA-DR+/CD79b+	BCL1(CCND1) t(11;14)(q13;q32) Negativa
14	SP	0,34	10,8	LNH Manto vs Marginal	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5-/(60%)/CD23+/CD20+/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200-/CD79b+/IgM+/-	ND
16	SP	0,67	11,61	LNH Manto	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23-/CD20+/ROR1+/CD43-/CD38+d/CD49d-/CD200-/IgM+/CD79b+	ND
27	SP	0,99	9,67	LNH Manto	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23-/CD20+/ROR1-/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200-/IgM+	BCL1(CCND1) t(11;14)(q13;q32) Negativa
4	MO	3,03	8,25	LNH marginal vs MALT	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5-/CD23-/CD20+/ROR1-/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200-/CD79b+/IgM+d/	ND
28	MO	0,64	11,67	LNH	CD19+/CD45+/KAPPA-/LAMBDA+/CD16-/CD56-/CD34-/CD117-	ND
35	MO	5,07	10,27	LNH DLCL	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5-/CD23-/CD20+/CD43-/CD38-/CD49d+/CD200-/CD79b+/IgM+	ND
24	MO	0,22	17,65	LNH CD5+	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10-/CD5+/CD23-/CD20+/ROR1+/CD43-/CD38-/-/CD49d+/CD200+/IgM-/-	ND
22	MO	0,94	8,81	LNH DLCL	CD19+/CD45+/KAPPA-/LAMBDA+/CD10-/CD5-/CD23-/CD20+/ROR1-/IgM+/CD79b+/CD200-	ND
36	MO	0,9	5,05	LNH CD10+ Folicular	CD19+/CD45+/KAPPA+/LAMBDA-/CD10+/CD5-/CD23-/CD20+/ROR1-/HLA-DR+/IgM+/CD22+/CD200-/CD79b+/-/CD38+	ND

Discusión

Poblaciones normales en médula ósea

La MO es el sitio de producción de células sanguíneas. Su proliferación varía según las necesidades fisiológicas o ante la presencia de malignidades hematológicas. Es un tejido heterogéneo en el que interactúan distintas células hematológicas y otras que definen el microambiente celular. Por medio de la CF es posible identificar entre distintas poblaciones y analizar de manera más reproducible y en menor tiempo que otras técnicas el ciclo celular a través de la cuantificación de ADN o por marcadores de proliferación, como DRAQ5 y ki67 respectivamente.

El marcador ki67, ampliamente utilizado en inmunohistoquímica, no se utiliza rutinariamente por medio de CF. Posiblemente esto se deba a que cuando se describió por primera vez el uso de este antígeno nuclear la CF no contaba con la capacidad de análisis multiparamétricos. Hoy, es posible por medio de distintos anticuerpos y marcadores celulares identificar las distintas subpoblaciones celulares y el porcentaje de células que lo expresan, lo cual refleja aquellas células que se encuentran en estado quiescente (ki67-) y aquellas que se encuentran ciclando (ki67+).

Mediante el uso del marcador de superficie pan leucocitario CD45, el marcador CD34 y el CD117 (marcadores de células progenitoras hematopoyéticas), la dispersión lateral y frontal fue posible identificar las principales subpoblaciones celulares en MO: eritroide, linfocitos, células granulocíticas, monocitos y células precursoras. Simultáneamente se logró evaluar el contenido de ADN de cada subpoblación y distinguir entre las células en fase G0/G1, S y G2M a través del marcador DRAQ5 y por medio de la identificación de células ki67 positivas se logró identificar aquellas subpoblaciones celulares proliferativas o en fase G1, S y G2-M.

La población eritroide se destacó por ser aquella con mayor porcentaje de células en fase S+G2M y la segunda con mayor expresión de ki67, este hallazgo coincide con lo demostrado por otros estudios (Nies et al., 2018; Yuan et al., 2004). Entre las razones que justifican la replicación de células eritroides está la necesidad fisiológica de recambio de glóbulos rojos. Se debe tomar en cuenta que las poblaciones totalmente maduras como los eritrocitos y reticulocitos que se encuentran en fase no replicativa no forman parte del análisis

debido a la metodología de lisis empleada en el presente estudio y que aquellas evaluadas son precursores eritroides como proeritroblastos y eritroblastos (células nucleadas).

Se demostró que las poblaciones con mayor inmadurez, identificadas por marcadores como CD34 y/o CD117 presentan mayor proliferación en comparación con las poblaciones maduras, a excepción de las células eritroides al utilizar ki67. Ambos marcadores permiten identificar HSCs. Las HSCs deben estar por un lado en constante replicación para regenerarse a sí mismas y generar células comprometidas que darán origen a las poblaciones maduras, pero por otro lado también muchas se encuentran en fase G0 con tal de que la reserva o pool celular se mantenga para situaciones de demanda (Hao et al., 2016; Yuan et al., 2004).

Se debe tomar en cuenta que la mitad de células hematopoyéticas CD117+ coexpresarán CD34. Esto se debe, en parte a que en línea eritroide se ha visto que los progenitores al madurar aumentan la expresión de CD117 mientras pierden la molécula CD34 y finalmente pierden el CD117 al madurar completamente. Por lo tanto, la mayor expresión de ki67 en las células precursoras CD117+ en comparación con las evaluadas como proliferativas CD34+ podría deberse a que el primer grupo contiene también precursores eritroides comprometidos y debido a su estado de inmadurez ciclan más debido a la mayor demanda diaria eritroide. Además, esto podría también dar razón de por qué las células eritroides poseen menos proliferación que las células precursoras al evaluar ki67, pues un porcentaje de las mismas y con mayor inmadurez se seleccionaron como células precursoras (ver figuras 4 y 5)(Escribano et al., 1998).

La población mieloide, compuesta por promielocitos, mielocitos, metamielocitos, bandas y neutrófilos maduros poseen una proliferación menor a la de precursores y de células eritroides. Distintos estudios dan razón a estos hallazgos, pues en su mayoría se tratan de células que componen el pool post mitótico. Estas son todas las células posteriores al mielocito que pierden su capacidad de división y únicamente maduran y serán movilizadas a sangre periférica ante situaciones de demanda como inflamación o infección. Además, los mielocitos y promielocitos restantes poseen una proporción de división heterogénea, y aquellas que proliferan lo realizan de una manera lenta, lo cual se ha llamado un “pool mitótico perezoso” (Hidalgo et al., 2019).

En relación con los monocitos, su producción depende de la proliferación de precursores y la mayoría de la población en MO corresponde a monocitos maduros que han perdido su capacidad de replicación. Su producción dependerá de igual manera de infecciones, procesos inflamatorios, tumores o estrés. Por lo que la replicación de progenitores comprometidos podría aumentarse ante estos casos (Matarraz et al., 2011).

Por ambos marcadores se determinó que los linfocitos maduros normales presentes en MO son las células con una menor proliferación.

Se ha demostrado que la mayoría linfocitos T a nivel medular, son de memoria y permanecen en estado quiescente a la espera de su activación antigénica e incluso se presume que se mantienen en fase G0 largos periodos, hasta décadas.

En cuanto a los linfocitos B maduros, predominan en MO los linfocitos B naive o los de memoria, ambos en fase G0. Los primeros se encuentran dispuestos para su salida de MO y su replicación y maduración en centros germinales, mientras que los de memoria están en espera de su activación antigénica y por esto se mantienen en quiescencia hasta que alguna señal externa como infecciones o algún proceso autoinmune los active (Perez-Andres et al., 2010).

Los linfocitos B además se mantienen en niveles estables durante la adultez y tienden a disminuir después de los 60 años. Las muestras analizadas poseen en promedio más de 60 años, por lo que no es esperable la proliferación de los mismos. Estos descensos en la cantidad de linfocitos B se hipotetiza que se debe a una menor exposición a nuevos antígenos lo cual lleva a un menor repertorio de células B de memoria o a una capacidad de amplificación de respuesta limitada por tantas repuestas previas a lo largo de la vida, lo que se describe como poblaciones exhaustas (Perez-Andres et al., 2010).

Se debe tener en cuenta también que la población analizada se caracteriza por la alta expresión de CD45, por lo tanto, son los linfocitos totalmente maduros. Aquellos con una menor expresión de CD45 son los precursores linfoides que se caracterizan por una mayor proliferación.

Proliferación en SLPC-B

La actividad proliferativa de las células B neoplásicas se ha considerado como un factor pronóstico en síndromes linfoproliferativos crónicos, tanto en relación con la supervivencia como en agresividad de la patología. Para esta evaluación se ha utilizado recurrentemente el análisis inmunohistoquímico con ki67.

En primer lugar, se debe señalar que se trabajaron tanto muestras de MO como de sangre periférica (tabla 4). Se ha descrito que las poblaciones linfoides normales maduras en MO poseen proliferación similar que aquellas en sangre periférica y los linfocitos de ganglios linfáticos poseen una mayor actividad replicativa (Quijano et al., 2008). Estos datos se pueden ver reflejados en la contraparte patológica, donde aquellos SLPC que provienen de linfocitos marginales o maduros que normalmente se encuentran quiescentes poseen menor proliferación que aquellos provenientes de centro germinal, lo cual se debe a las distintas señales que puede proveer el microambiente para una replicación celular aumentada.

Además, los valores de proliferación obtenidos se vieron sub o sobreestimados según el caso, debido a que la selección de las poblaciones linfoides aberrantes contenía linfocitos no patológicos que igualmente expresaban CD45 fuertemente con un SSC reducido.

Distintos reportes indican que los SLP-B con tasas proliferativas bajas se relacionan con aquellos linfomas de bajo grado, mientras que las altas tasas proliferativas (S+G2M más de 10%) se asocian con un curso clínico agresivo. Los casos analizados en su mayoría se trataron de LNH de bajo grado, que actualmente se identifican según la OMS como LNH de células pequeñas. Estos incluyen LLC/linfoma linfocítico de células pequeños, linfoma folicular, linfoma marginal nodal, MALT, LNH de manto, leucemia de células peludas y leucemia prolinfocítica.

De los casos analizados, 11/14 se catalogaron como de bajo grado, 2/14 de alto grado y uno no clasificable y ninguno sobrepasó el 10% en fase S+G2M de corte propuesto en CF por Quijano *et al.* El caso con mayor porcentaje fue un caso de LNH DCLC tal y como era lo esperable debido a que este subtipo se relaciona con una mayor proliferación por su posible origen de centro germinal y por lo tanto una mayor agresividad.

Existió mayor variación en el porcentaje en el análisis de ki67. En el caso de las LLC, Del Poeta y otros sugieren un corte de positividad por ki67 de 5%. Valores mayores a este

corte en pacientes CD19+CD5+ se asociaron significativamente con estadio de Rai intermedio/alto, mayores concentraciones de Beta 2 microglobulina, y de CD23 soluble. Además, en conjunto con menor expresión de bax/bcl-2 se asocian con estados no mutados de IGHV, y con presencia de mutaciones en TP53. Es decir, casos con porcentajes mayores a 5% se proponen como de peor pronóstico y con mayor probabilidad de transformación.

El caso que presentó un porcentaje de proliferación mayor por ki67 se trató de una LLC (caso 5) y como hallazgo de interés se trataba de un caso con IGHV no mutado. El estado de IGHV y el porcentaje de ki67 determinado por citometría de flujo se han demostrado por análisis de múltiples variables como factores pronósticos adversos independientes para la supervivencia promedio (Del Poeta *et al*, 2015). Además, estas células presentaron positividad para el marcador CD49d relacionado también con mal pronóstico (Brachtl *et al.*, 2014).

La muestra con la segunda mayor expresión de ki67 se trató de un LNH CD5+ (caso 24) que no cumplía con los criterios inmunofenotípicos para ser catalogado como LLC. De igual manera se podría sugerir que su elevada proliferación podría estar asociada a mayor agresividad reflejada también por la expresión de CD38, marcador de mal pronóstico en linfoma de manto y LLC, posibles diagnósticos por confirmar en este caso (Brachtl *et al.*, 2014; Calabretta & Carlo-stella, 2020).

El caso 17, de igual manera sobrepasó el punto de corte de 5% y podría estar asociado a la expresión de los marcadores CD38+ y CD49d+. Cabe destacar que esta muestra no contaba con alteraciones genéticas de mal pronóstico y su origen marginal, al ser IGHV mutado, podría ser una de las razones por las que no presentó tanta proliferación como el caso 5.

Las dos muestras con LLC restantes no expresaron CD38, por lo que desde el punto de vista inmunofenotípico no se asocian con un mal pronóstico. Se podría sospechar que esto se refleja en el porcentaje de positividad por ki67, tal y como se reporta en la literatura (Marcondes *et al.*, 2018).

Los casos de posibles LNH manto mostraron como máximo 11.61% (caso 16). La relativa baja proliferación podría deberse a que ninguno de los casos estudiados se describió como un subtipo blastoide indicativo de mal pronóstico. Se ha propuesto que un corte de 20%

ki67+ es clínicamente significativo para este subtipo de LNH y que en pacientes con infiltración medular el corte podría elevarse hasta 30% (Jeong et al., 2016). Se debe tomar en cuenta que estos estudios se basan en inmunohistoquímica, por lo que para valorar la utilidad clínica de nuestro análisis se deben realizar nuevos estudios utilizando CF.

Además, dos de los casos no llegaron a confirmarse como LNH de manto debido a la ausencia de la traslocación 11;14 que se caracteriza por la sobreexpresión de la ciclina D1. Al existir esta traslocación hay un aumento en la transición de la fase G1 a la fase S (Jeong et al., 2016). Estos casos requieren más estudios para redefinir su diagnóstico y evaluar de mejor manera su proliferación.

Dos de los casos se determinaron como LNH DLCL. Los LNH DLCL se determinan en su mayoría como de alto grado. Existen dos subtipos principales de LNH DLCL. La expresión de CD10 define el subtipo derivado como de LNH DLCL de centro germinal, mientras que aquellos con ausencia de este antígeno y con expresión del oncogén de mieloma múltiple (MUM1) se clasifican como de origen distinto al centro germinal (Azoulay et al., 2020). Ninguno de los casos expresó CD10 por lo que no fue posible determinarlo como de centro germinal y ante la falta de información genética tampoco fue posible excluir este diagnóstico.

A pesar de lo esperado, ambos casos de LNH DLCL presentaron reducidos porcentajes de ki67. Esto podría deberse a que se trata de casos de buen pronóstico o que sus centros de proliferación se encuentran localizados en otros tejidos no evaluados.

Únicamente un caso CD10+ fue evaluado. Este correspondió fenotípicamente a un LNH folicular. Al igual a lo reportado en la literatura del caso analizado, se obtuvo una tasa proliferativa reducida, menor a lo esperado para una patología de centro germinal. Esto podría deberse a mutaciones que favorezcan la supervivencia de los linfocitos patológicos (por ejemplo t(14;18) con sobreexpresión de BCL2) y no tanto a aumentos en proliferación (asociados con rearrreglos en C-MYC) (Quijano et al., 2008).

Se debe tener en cuenta que en el presente estudio no se trabajó con LNH de Burkitt, ni otro linfoma de alto grado, los cuales se caracterizan por elevadas tasas de proliferación

debido a las traslocaciones que activan constitutivamente al gen C-MYC tales como t(8;14), t(2;8) o t(8;22) (Naresh et al, 2011; Quijano et al., 2008).

Según los resultados obtenidos y lo reportado en la literatura, las tasas de proliferación de los SLPC-B aparte de estar asociados a sus contrapartes normales también pueden estar influenciadas en gran escala por anormalidades genéticas que modifican su comportamiento. Se sugiere realizar estudios más amplios que permitan asociar inmunofenotipo, índices de proliferación y alteraciones genéticas para el mayor entendimiento del ciclo celular de las enfermedades hematológicas y así definir puntos de corte para una posible mejor evaluación clínica.

Diferencias entre S+G2M y Ki67+

Se debe recordar que ki67 marca como positivas las poblaciones que se encuentran en fase G1, S, G2 y M, mientras que DRAQ5 no permite discernir entre células G1 y G0 y se identifican como proliferativas las poblaciones en fase S y G2M. El porcentaje de células en fase G1, no identificadas como proliferativas en el análisis con DRAQ5, podrían ser la principal diferencia entre los análisis realizados. Por ejemplo, al analizar los SLPC-B no parece existir correlación (Di Rosa et al., 2021).

La fase G1 puede tener una duración variable y detectarse como ki67+ por distintos motivos. Podría ser una célula en G0 que se encuentra reingresando al ciclo celular o provenir de un evento mitótico que recién acaba de generar dos células hijas. Por lo tanto, las células ki67+ en G1 podrían encontrarse en esta fase por mucho tiempo, estar en el momento de análisis progresando a fase S o dirigirse a la fase G0 (Di Rosa et al., 2021).

Además, se ha demostrado que el ki67 se degrada continuamente durante la fase G0 y G1 y se produce de manera constante desde el inicio de la fase S hasta la mitosis, por lo que la expresión de este marcador varía constantemente. Se ha propuesto incluso que no es correcto manejarlo como un marcador binario, es decir no se debe considerar una célula como ki67 positiva o negativa, sino que debe estudiarse como un espectro. El porcentaje de positividad por lo tanto refleja no solo el estado en el ciclo celular sino que también representa la historia de la misma, entre más tiempo ha estado una célula en quiescencia menor será el nivel de ki67 aunque reingrese al ciclo celular (Miller et al., 2018).

Estos recientes hallazgos permiten entender de mejor manera los resultados obtenidos. Además, respalda el uso de herramientas más reproducibles y robustas como la CF que permite estimar de mejor manera la intensidad de expresión de ki67 célula por célula.

Conclusiones

Se logró evaluar la proliferación de distintas poblaciones hematopoyéticas por medio de ki67 y DRAQ5 y anticuerpos de uso común mediante CF. Se comprobó que existe mayor tasa proliferativa en los precursores hematopoyéticos en comparación con las poblaciones maduras. Además, las células eritroides en MO poseen mayor cantidad de células ciclando, seguidas por las poblaciones monocíticas y granulocíticas, mientras que los linfocitos poseen menor proliferación entre las poblaciones evaluadas.

Se corroboró que los LNH de bajo grado poseen bajos porcentajes de proliferación; sin embargo, podrían existir variaciones por alteraciones genéticas u otros factores no contemplados en este estudio.

Parece existir correlación entre las poblaciones determinadas por DRAQ5 y por ki67, sin embargo, podría haber variaciones por la presencia de células en fase G1, no incluidas como proliferativas al usar DRAQ5. Para definir si existe o no correlación debe continuarse el estudio, procesar mayor cantidad de muestras y elaborar modelos estadísticos que permitan confirmar lo propuesto.

Se recomienda para una mejor evaluación de las fases del ciclo celular y la proliferación utilizar anti ki67 y marcadores de ADN como DRAQ5 en un mismo tubo, en conjunto con otros anticuerpos para discernir las poblaciones de interés.

En conclusión, el ki67 es de utilidad para análisis por CF del ciclo celular y proliferación. Se deben aumentar las investigaciones con este marcador, evaluar distintas metodologías y tipos de muestras bajo la tecnología actual de CF. De esta manera se podrá complementar y/o mejorar las técnicas usadas tradicionalmente, el entendimiento de la proliferación celular, establecer puntos de corte según cada patología y brindar información de relevancia clínica en cada individuo.

Referencias bibliográficas

Alderton, G. (1969). *Cell Microfluorometry: A Method for. March.*

Aljama, M. A., Hasib Sidiqi, M., Lakshman, A., Dispenzieri, A., Jevremovic, D., Gertz, M. A., Lacy, M. Q., Buadi, F. K., Dingli, D., Muchtar, E., Fonder, A. L., Hayman, S. R., Hobbs, M. A., Gonsalves, W. I., Warsame, R., Kourelis, T. V., Hwa, Y. L., Kapoor, P., Leung, N., ... Kumar, S. K. (2018). Plasma cell proliferative index is an independent predictor of progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Advances*, 2(22), 3149–3154. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024794>

Almeida, J., Orfao, A., Mateo, G., Ocqueteau, M., Garcia-Sanz, R., Moro, M. J., Hernandez, J., Ortega, F., Borrego, D., Barez, A., Mejido, M., & San Miguel, J. F. (1999). Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathologie Biologie*, 47(2), 119–127.

Ashman, R. B. (2012). Detailed protocols and practical advice on a variety of modern approaches to the study of leucocytes and their products. Preface. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 844. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5>

Azoulay, D., Cohen, H. I., Dementiev, E., Eshel, E., Akria, L., Shaoul, E., & Horowitz, N. (2020). Flow cytometry aneuploidy and cell cycle indexing as a possible tool for differentiating between CD10+ diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 98(5), 449–453. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21861>

Barilà, G., Bonaldi, L., Grassi, A., Martines, A., Liço, A., Macrì, N., Nalio, S., Pavan, L., Berno, T., Branca, A., Calabretto, G., Carrino, M., Teramo, A., Manni, S., Piazza, F., Semenzato, G., & Zambello, R. (2020). Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood Cancer Journal*, 10(2). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-0285-6>

Brachtl, G., Hofbauer, J. P., Greil, R., & Hartmann, T. N. (2014). *The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia.* 361–374. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1967-y>

- Broyde, A., Boycov, O., Strenov, Y., Okon, E., Shpilberg, O., & Bairey, O. (2009). Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Hematology*, *84*(6), 338–343. <https://doi.org/10.1002/ajh.21406>
- Calabretta, E., & Carlo-stella, C. (2020). *Tumor – Microenvironment Cell Interactions to*.
- Carroll, A. J., Shago, M., Mikhail, F. M., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., Loh, M. L., Raetz, E. A., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Maloney, K. W., Mattano, L. A., Larsen, E. C., Gastier-Foster, J., Stonerock, E., Ell, D., Kahwash, S., Devidas, M., Harvey, R. C., Chen, I.-M. L., ... Heerema, N. A. (2019). Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Genetics*, *238*(3), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cancer.2019.07.009>
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A., & Meedeniya, A. C. B. (2011). Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*, *16*(9), 7980–7993. <https://doi.org/10.3390/molecules16097980>
- Chieco, P., & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, *111*(5), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s004180050367>
- Dai, Y., Jin, F., Wu, W., & Kumar, S. K. (2019). Cell cycle regulation and hematologic malignancies. *Blood Science*, *1*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1097/bs9.0000000000000009>
- Damle, R. N., Temburni, S., Calissano, C., Yancopoulos, S., Banapour, T., Sison, C., Allen, S. L., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2007). CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, *110*(9), 3352–3359. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-083832>
- Darzynkiewicz, Z. (1990a). Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. In *Gait and Posture* (Vol. 33, pp. 285–298). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60532-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60532-4)
- Darzynkiewicz, Z. (1990b). Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. In *Gait and Posture* (Vol. 33, pp.

285–298). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60532-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60532-4)

Darzynkiewicz, Z. (2011). Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content. *Current Protocols in Cytometry*, 56(1), 255–262. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0702s56>

Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*, 38(2), 179–193. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90051-4)

Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., & Jacobberger, J. W. (2004). Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. *Cytometry*, 58A(1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20003>

Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., & Traganos, F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, 25(1), 1–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960901\)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N)

Darzynkiewicz, Z., Huang, X., & Zhao, H. (2017a). Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 82(1), 7.5.1-7.5.20. <https://doi.org/10.1002/cpcy.28>

Darzynkiewicz, Z., Huang, X., & Zhao, H. (2017b). Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 82(1), 7.5.1-7.5.20. <https://doi.org/10.1002/cpcy.28>

Di Rosa, F., Cossarizza, A., & Hayday, A. C. (2021). To Ki or Not to Ki: Re-Evaluating the Use and Potentials of Ki-67 for T Cell Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12(April), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653974>

El-Naggar, A. K. (2004a). Concurrent Flow Cytometric Analysis of DNA and RNA. In *Flow Cytometry Protocols* (Vol. 263, pp. 371–384). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-773-4:371>

El-Naggar, A. K. (2004b). Concurrent Flow Cytometric Analysis of DNA and RNA. In *Flow Cytometry Protocols* (Vol. 263, pp. 371–384). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-773-4:371>

- Escribano, L., Ocqueteau, M., Almeida, J., Orfao, A., & San Miguel, J. F. (1998). Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma*, 30(5–6), 459–466. <https://doi.org/10.3109/10428199809057558>
- Gupta, N., Parihar, M., Banerjee, S., Brahma, S., Pawar, R., Rath, A., Shewale, S., Singh, M., Sasikumaran Nair Remani, A., Krishnan, S., Bhattacharyya, A., Das, A., Kumar, J., Bhave, S., Radhakrishnan, V., Nair, R., Chandy, M., Mishra, D., & Arora, N. (2019). FxCycle™ Based Ploidy Correlates with Cytogenetic Ploidy in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Is Able to Detect the Aneuploid Minimal Residual Disease Clone. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 96(5), 359–367. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21765>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, S., Chen, C., & Cheng, T. (2016). Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. *International Journal of Hematology*, 103(5), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-1984-4>
- Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C., & Koenderman, L. (2019). The Neutrophil Life Cycle. *Trends in Immunology*, 40(7), 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>
- Hiddemann, W., Schumann, J., Andreef, M., Barlogie, B., Herman, C. J., Leif, R. C., Mayall, B. H., Murphy, R. F., & Sandberg, A. A. (1984). Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 13(2), 181–183. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(84\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0165-4608(84)90059-1)
- Jacobberger, J. W., Frisa, P. S., Sramkoski, R. M., Stefan, T., Shults, K. E., & Soni, D. V. (2008). A new biomarker for mitotic cells. *Cytometry Part A*, 73(1), 5–15. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20501>
- Jacobberger, J. W., Sramkoski, R. M., Stefan, T., & Woost, P. G. (2018). Multiparameter cell cycle analysis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1678, Issue Table 1). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_11
- Jeong, T. D., Chi, H. S., Kim, M. S., Jang, S., Park, C. J., & Huh, J. R. (2016). Prognostic

- relevance of the Ki-67 proliferation index in patients with mantle cell lymphoma. *Blood Research*, 51(2), 127–132. <https://doi.org/10.5045/br.2016.51.2.127>
- Juan, G., Gong, J., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (1996). Unscheduled expression of cyclins D1 and D3 in human tumour cell lines. *Cell Proliferation*, 29(5), 259–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.1996.01000.x>
- Juan, Gloria, Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (2001). Methods to identify mitotic cells by flow cytometry. *Methods in Cell Biology*, 63(63), 343–354. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(01\)63019-x](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(01)63019-x)
- Kim, K. H., & Sederstrom, J. M. (2015). Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, 111(1), 139–148. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s111>
- Krueger, S. A., & Wilson, G. D. (2011). Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods in Molecular Biology*, 731, 359–370. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_29
- Larsen, J. K., Landberg, G., & Roos, G. (2001). Detection of proliferating cell nuclear antigen. *Methods in Cell Biology*, 63(63), 419–431. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(01\)63023-1](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(01)63023-1)
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Predic Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Look, A. T., Roberson, P. K., Williams, D. L., Rivera, G., Bowman, W. P., Pui, C. H., Ochs, J., Abromowitch, M., Kalwinsky, D., & Dahl, G. V. (1985). Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 65(5), 1079–1086. <https://doi.org/10.1182/blood.v65.5.1079.1079>
- Marcondes, N., Fernandes, F., & Faulhaber, G. (2018). Ki-67 expression in mature B-cell neoplasms: A flow cytometry study. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 64(6), 525–529. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.06.525>
- Margaret, G. (2005). *Stem Cell Identification and Sorting Using the Hoechst 33342 Side*

Population (SP) STAINING AND ANALYSIS OF STEM CELL SIDE POPULATION IN MURINE BONE MARROW. 1–11.

- Marshall, T., & Rutledge, J. C. (2000). Flow cytometry DNA applications in pediatric tumor pathology. *Pediatric and Developmental Pathology*, 3(4), 314–334. <https://doi.org/10.1007/s100249910047>
- Martin, R. M., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2005). DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*, 67(1), 45–52. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20172>
- Matarraz, S., Fernandez, C., Albors, M., Teodosio, C., López, A., Jara-Acevedo, M., Cervero, C., Caballero, G., Gutierrez, O., & Orfao, A. (2011). Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: A frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 80 B(6), 354–361. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20605>
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., & Spence, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence Graphical Abstract HHS Public Access. *Cell Rep*, 24(5), 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110.Ki67>
- Molina, O., Abad, M. A., Solé, F., & Menéndez, P. (2021). Aneuploidy in Cancer: Lessons from Acute Lymphoblastic Leukemia. *Trends in Cancer*, 7(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.08.008>
- Naresh, K. N., Ibrahim, H. A. H., Lazzi, S., Rince, P., Onorati, M., Ambrosio, M. R., Bilhou-Nabera, C., Amen, F., Reid, A., Mawanda, M., Calbi, V., Ogowang, M., Rogena, E., Byakika, B., Sayed, S., Moshi, E., Mwakigonja, A., Raphael, M., Magrath, I., & Leoncini, L. (2011). Diagnosis of Burkitt lymphoma using an algorithmic approach - applicable in both resource-poor and resource-rich countries. *British Journal of Haematology*, 154(6), 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08771.x>
- Nies, K. P. H., Kraaijvanger, R., Lindelauf, K. H. K., Drent, R. J. M. R., Rutten, R. M. J., Ramaekers, F. C. S., & Leers, M. P. G. (2018). Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry Part A*, 93(11), 1097–1105. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23564>

- Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 67–70. <https://doi.org/10.21775/cimb.003.067>
- Paiva, B., Vídriales, M. B., Montalbán, M. Á., Pérez, J. J., Gutiérrez, N. C., Rosiñol, L., Martínez-López, J., Mateos, M. V., Cordon, L., Oriol, A., Terol, M. J., Echeveste, M. A., De Paz, R., De Arriba, F., Palomera, L., De La Rubia, J., Díaz-Mediavilla, J., Sureda, A., Gorosquieta, A., ... San Miguel, J. F. (2012). Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *American Journal of Pathology*, 181(5), 1870–1878. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.020>
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Marti, G. E., Rawstron, A. C., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J. M., Johnsen, H. E., Klein, B., & Orfao, A. (2010). Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 78(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20547>
- Pérez-Persona, E., Vidriales, M. B., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M. V., De Coca, A. G., Galende, J., Martín-Nuñez, G., Alonso, J. M., De Heras, N. Las, Hernández, J. M., Martín, A., López-Berges, C., Orfao, A., & San Miguel, J. F. (2007). New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, 110(7), 2586–2592. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-088443>
- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 281, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>
- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Barrena, S., Sánchez, M. L., Flores, J., Fernández, C., Sayagués, J. M., Osuna, C. S., Fernández, N., González, M., Giraldo, P., Giralt, M., Pérez, M. C., Martín-Antoran, J. M., Gutiérrez, O., Perdiguier, L., Mediavilla, J. D., Silva, M. G., ... Orfao, A. (2008). Association between the proliferative rate of

- neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: Analysis of a series of 432 patients. *Blood*, *111*(10), 5130–5141. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-119289>
- Rachieru-Sourisseau, P., Baranger, L., Dastugue, N., Robert, A., Geneviève, F., Kuhlein, E., & Chassevent, A. (2010). DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: A karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *International Journal of Laboratory Hematology*, *32*(3), 288–298. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2009.01189.x>
- Roberts, K. G. (2018). Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology (United States)*, *2018*(1), 137–145. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.137>
- Rothausler, K., & Baumgarth, N. (2007a). Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.], Chapter 7*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0731s40>
- Rothausler, K., & Baumgarth, N. (2007b). Assessment of Cell Proliferation by 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) Labeling for Multicolor Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, *40*(1), 155–175. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0731s40>
- Shapiro, H. M. (2000a). RNA Content Determination Using Pyronin Y. In *In Living Color* (Issue Cmc, pp. 357–360). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57049-0_28
- Shapiro, H. M. (2000b). RNA Content Determination Using Pyronin Y. In *In Living Color* (Issue Cmc, pp. 357–360). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57049-0_28
- Shimoda, M., Ota, M., & Okada, Y. (2018). Isolation of cancer stem cells by side population method. *Methods in Molecular Biology*, *1692*, 49–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_5
- Sidana, S., Jevremovic, D., Ketterling, R. P., Tandon, N., Dispenzieri, A., Gertz, M. A.,

- Greipp, P. T., Baughn, L. B., Buadi, F. K., Lacy, M. Q., Morice, W., Hanson, C., Timm, M., Dingli, D., Hayman, S. R., Gonsalves, W. I., Kapoor, P., Kyle, R. A., Leung, N., ... Kumar, S. K. (2019). Rapid assessment of hyperdiploidy in plasma cell disorders using a novel multi-parametric flow cytometry method. *American Journal of Hematology*, *94*(4), 424–430. <https://doi.org/10.1002/ajh.25391>
- Sidiqi, M. H., Aljama, M. A., Jevremovic, D., Morice, W. G., Timm, M., Buadi, F. K., Warsame, R., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Dingli, D., Gonsalves, W. I., Kumar, S., Kapoor, P., Kourelis, T., Leung, N., Hogan, W. J., & Gertz, M. (2018). Plasma cell proliferative index predicts outcome in immunoglobulin light chain amyloidosis treated with stem cell transplantation. *Haematologica*, *103*(7), 1229–1234. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189985>
- Smith, P. J., Blunt, N., Wiltshire, M., Hoy, T., Teesdale-Spittle, P., Craven, M. R., Watson, J. V., Brad Amos, W., Errington, R. J., & Patterson, L. H. (2000). Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry*, *40*(4), 280–291. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20000801\)40:4<280::AID-CYTO4>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20000801)40:4<280::AID-CYTO4>3.0.CO;2-7)
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, *127*(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Sun, Y., Yang, K., Bridal, T., & Ehrhardt, A. G. (2016). Robust Ki67 detection in human blood by flow cytometry for clinical studies. *Bioanalysis*, *8*(23), 2399–2413. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0194>
- Swerts, K., Van Roy, N., Benoit, Y., Laureys, G., & Philippé, J. (2007). DRAQ5: Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clinica Chimica Acta*, *379*(1–2), 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.12.008>
- Telford, W. G., King, L. E., & Fraker, P. J. (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, *13*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1002/cyto.990130205>

- Tembhare, P., Badrinath, Y., Ghogale, S., Patkar, N., Dhole, N., Dalavi, P., Kunder, N., Kumar, A., Gujral, S., & Subramanian, P. G. (2016). A novel and easy FxCycle™ violet based flow cytometric method for simultaneous assessment of DNA ploidy and six-color immunophenotyping. *Cytometry Part A*, 89(3), 281–291. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22803>
- Toprak, S. K., Dalva, K., Çakar, M. K., Kurşun, N., & Beksaç, M. (2012). Flow cytometric evaluation of cell cycle regulators (cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors) expressed on bone marrow cells in patients with chronic myeloid leukemia and multiple myeloma. *Turkish Journal of Hematology*, 29(1), 17–27. <https://doi.org/10.5505/tjh.2012.33602>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- Vignon, C., Debeissat, C., Georget, M. T., Bouscary, D., Gyan, E., Rosset, P., & Herault, O. (2013). Flow Cytometric Quantification of All Phases of the Cell Cycle and Apoptosis in a Two-Color Fluorescence Plot. *PLoS ONE*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068425>
- Wang, S., Li, N., Heald, P., Fisk, J. M., Fadare, O., Howe, J. G., McNiff, J. M., & Smith, B. R. (2004). Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with Sézary syndrome: Detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(5), 774–782. <https://doi.org/10.1309/8B849FC6PHAP8FDD>
- Yu, C. H., Lin, T. K., Jou, S. T., Lin, C. Y., Lin, K. H., Lu, M. Y., Chen, S. H., Cheng, C. N., Wu, K. H., Wang, S. C., Chang, H. H., Li, M. J., Ni, Y. L., Su, Y. N., Lin, D. T., Chen, H. Y., Harrison, C. J., Hung, C. C., Lin, S. W., & Yang, Y. L. (2020). MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68311-9>
- Yuan, C. M., Douglas-Nikitin, V. K., Ahrens, K. P., Luchetta, G. R., Braylan, R. C., & Yang, L. (2004). DRAQ5-Based DNA Content Analysis of Hematolymphoid Cell

Subpopulations Discriminated by Surface Antigens and Light Scatter Properties.
Cytometry Part B - Clinical Cytometry, 58(1), 47–52.
<https://doi.org/10.1002/cyto.b.20000>