

Correlación interlaboratorio en la valoración de la expresión de Glicoproteína P en sangre periférica por citometría de flujo

GUILLÉN M(1), O'VALLE F(2), OLMO A(2), AGUILAR M(2),
OYONARTE S(3), GARCÍA DEL MORAL R(2).

(1) *Cátedra de Citología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes.
Venezuela. Telf.: 00-58-274.403499.*

(2) *Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
España. Telef. 00-34-958-243509*

(3) *Centro de Transfusión Sanguínea de Granada. España.*

RESUMEN

La Glicoproteína P (Gp-P) es una proteína transmembranaria con función transportadora, que tiene por misión expeler xenobióticos lipofílicos. Esta glicoproteína tiene una distribución específica y unos niveles de expresión variables en las células sanguíneas humanas en cargadas de la defensa en el organismo. El objetivo de este trabajo fue comparar y establecer si son reproducibles los resultados obtenidos por dos laboratorios distintos en la valoración de la expresión de glicoproteína P (Gp-P) en muestras celulares con baja expresión de esta glicoproteína, como es el caso de las células de sangre periférica. Se valoraron las subpoblaciones celulares de ciento veinticinco (125) muestras de sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo e inmunofluorescencia directa, utilizando el anticuerpo monoclonal JSB-1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), en dos citómetros de flujo de la misma marca y modelo, situados en dos laboratorios diferentes: Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Granada y Centro de Transfusión Sanguínea de Granada, España. Los resultados demostraron que la mejor correlación estadística del porcentaje de Positividad (% POS) fue observada en los linfocitos ($r=0.93$), mientras que para la Incorporación Media de Fluorescencia Específica (IMFE) se observó en los granulocitos ($r=0.94$). Los resultados obtenidos con la metodología empleada en la determinación de la Gp-P por citometría de flujo e inmunofluorescencia directa, permiten concluir que es una técnica reproducible y fiable para la evaluación del fenómeno de Resistencia Múltiple a Drogas (MDR) en las subpoblaciones celulares normales de sangre periférica.

ABSTRACT

P glycoprotein is a transmembrane transporting protein that expells lipophilic compounds. It has a specific distribution and variable level of expression in defense blood cells. The aim of this research was to compare and establish if the results obtained by two different laboratories in assessing the expression of P-Gp in human blood cells are reproducible using flow cytometry and direct immunofluorescence. Blood samples of one hundred twenty five (125) healthy people were evaluated using flow cytometry and direct immunofluorescence, with JSB-1 monoclonal antibody conjugated with fluorescein isotiocianate (FITC), in two identical flow cytometers located the first in the Department of Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, and the second in Centro de Transfusión Sanguínea de Granada, España. The best statistical correlation was observed for %POS in the lymphocytes subset ($r=0.93$) and the best Mean Specific Fluorescence Intake (MSFI) was observed in the granulocytes subset ($r=0.94$). The results obtained using flow cytometry and direct immunofluorescence has showed that the method is reliable and reproducible to evaluate the Multiple Drug Resistance (MDR) phenomenon in normal peripheral blood cell subpopulations.

PALABRAS CLAVE

MDR1, Glicoproteína P, leucocitos

INTRODUCCIÓN

La Glicoproteína P (Gp-P) es una proteína transmembrana con función transportadora

dependiente de energía, que tiene por misión expeler xenobióticos lipofílicos del interior de las células disminuyendo su concentración y evitando que alcance la diana celular. La Gp-P responsable del fenómeno MDR en las células neoplásicas, también se ha identificado en tejidos normales como corteza suprarrenal, túbulo contorneado proximal renal, en precursores linfoides de médula ósea y en linfocitos de sangre periférica, donde se ha detectado ARNm del gen MDR1 aunque en baja expresión (*Noonan et al, 1990*).

La diversidad de métodos y técnicas disponibles para abordar el estudio del fenómeno MDR ha propiciado una gran variabilidad en los resultados, tanto inter como intralaboratorio, y ha puesto de manifiesto la necesidad de establecer unas líneas maestras para la detección de la Gp-P y del ARNm del gen MDR1 que permitan obtener resultados más reproducibles. Así, en la reunión de especialistas en el estudio del fenómeno MDR, celebrada en Memphis en 1994 (*Beck et al, 1996*), se alcanzaron una serie de conclusiones de consenso preliminares para establecer la estandarización de los métodos de estudio del fenómeno de multirresistencia a fármacos, especialmente para la determinación del genotipo (MDR1) y del fenotipo (Gp-P) en muestras clínicas. Estudios multicéntricos posteriores han demostrado la elevada variabilidad que existe en los resultados de la evaluación del fenotipo MDR ligado a Gp-P en las muestras y recomiendan realizar la estandarización de los ensayos mediante la aplicación de las conclusiones de consenso establecidas por Beck y colaboradores (*Chevillard et al, 1997*). En 1997 Beck y Grogan, desarrollaron con mayor detenimiento las recomendaciones reseñadas de Memphis y abrieron el camino a nuevas reuniones para el estudio del fenómeno MDR y la estandarización de su evaluación (*Beck y Grogan, 1997*).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar y establecer si son reproducibles los resultados obtenidos por dos laboratorios distintos en la valoración de la expresión de la Gp-P en muestras celulares con baja expresión de esta glicoproteína, como es el caso de las células sanguíneas de sangre periférica de individuos sanos, utilizando para ello la citometría de flujo e inmunofluorescencia directa.

PACIENTES Y MÉTODOS

Muestras Sanguíneas

Las muestras sanguíneas de los individuos sanos se obtuvieron de los donantes de sangre que asistieron al Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada, tras consentimiento obtenido para participar en el estudio. La media de la edad de los donantes estudiados fue $32,36 \pm 11,02$ años, predominando los sujetos comprendidos entre los 18 y 35 años (69.35%). La edad mínima fue 18 y la máxima 65 años. En cuanto a la distribución por géneros, un total de 81 (64,80%) correspondían a hombres y 44 (35,2%) a mujeres. En todos los casos, se realizó la determinación de los niveles de Gp-P en las células nucleadas por inmunofluorescencia directa, mediante citometría de flujo.

Líneas Celulares

En la detección de la Glicoproteína P se utilizó como control positivo la línea celular de Fibroblastos de ratón, NIH-3T3-G185 transfectada con el gen MDR1 humano y como control negativo la línea celular de Fibroblastos parental NIH-3T3. Ambas líneas celulares fueron cedidas a nuestro laboratorio en el año 1997 por el Dr. Cardelli, investigador perteneciente al laboratorio de biología molecular del National Institute of Health (NIH) de Bethesda, Estados Unidos. Fueron mantenidas según los procedimientos estándar de cultivos celulares y posteriormente criopreservadas en DMSO (Merck) adicionado al 10% (v/v) sobre el medio de cultivo DMEM y enriquecido con un 5-10% de suero bovino fetal (SBF) (*O'Valle et al, 1993*).

Inmunofluorescencia Directa y Citometría de Flujo

Metodología

La determinación de la Gp-P se hizo utilizando 100 μ L de sangre total según el siguiente procedimiento técnico: Pretratamiento de los hematíes con la solución de lisado (Ortho Diagnostic), seguido de la fijación de las células sanguíneas nucleadas con formaldehído al 3,7% (Sigma F1268) en tampón fosfato con albúmina bovina sérica al 0.1% (PBS-BSA) pH=7.2 y permeabilización con Tween 20 al 0,2% (Sigma P7949) en PBS-BSA. Posteriormente, se bloqueó la reactividad inespecífica de los anticuerpos con suero humano AB al 2% y tras centrifugar y lavar, se incubó con 5 μ L del anticuerpo monoclonal contra la Gp-P conjugado con Fluoresceína (FITC) (clona JSB1) (Master Diagnóstica) o 10 μ L del control isotipo con IgG1-FITC (Master Diagnóstica) durante 30 minutos, en oscuridad. Finalmente, se mantuvieron durante la noche en

Formaldehído al 1% y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su lectura. Se realizó además una doble tinción con marcadores para linfocitos y monocitos conjugados con FITC.

En todas las líneas celulares utilizadas, la determinación de la Gp-P se hizo utilizando una suspensión con una concentración de 1250×10^6 células μL^{-1} , siguiendo la técnica descrita anteriormente. Las muestras se analizaron en dos citómetros de flujo (Cytoron Absolute, Ortho Diagnostic), ubicados el primero en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y el segundo en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada, España. Se utilizó el programa informático IMMUNOCOUNT II (Ortho Diagnostic), para estudiar la expresión de la Gp-P en células mononucleadas sanguíneas de forma independiente. Se utilizaron ventanas móviles para seleccionar los linfocitos y monocitos marcados con FITC y los granulocitos por tamaño y granularidad. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas (% POS) y la incorporación media de fluorescencia específica (IMFE).

Estudio Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa informático RSIGMA BABEL (Honorus Hardware), asumiendo como máximo un error alfa del 5% ($p < 0.05$) en todas las pruebas realizadas. La normalidad de las variables se valoró mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis comparativo de la distribución de medias aritméticas de variables normales se realizó mediante el test de Student (t de Student). La relación entre variables normales se estableció mediante regresión lineal y determinación de los coeficientes de correlación lineales de Pearson y Spearman.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 125 muestras de sangre periférica de donantes de sangre, procedentes del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada, una vez comprobada la negatividad para marcadores virales anti-VHC, anti-VIH 1 + 2 y antígeno VHB.

En la Tabla 1, se presentan los resultados del % POS y la IMFE de la Gp-P por citometría de flujo, en dos citómetros diferentes: Citómetro de Flujo 1 (CF1) (Departamento de Anatomía Patológica) y Citómetro de flujo 2 (CF2) (Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada), observándose que para el porcentaje de células positivas los valores eran semejantes en ambos citómetros de flujo (Gráfico 1, t de Student N.S.= no significativo) mientras que para la incorporación media de fluorescencia específica (IMFE), los detectados por el CF2 fueron más elevados que aquellos detectados por el CF1 (Gráfico 2, t de Student, $p < 0.001$).

Tabla 1. Expresión de Gp-P en individuos sanos expresado en Porcentaje de Positividad (% POS) e Incorporación Media de Fluorescencia Específica (IMFE) en las líneas celulares controles y las subpoblaciones de sangre periférica.

	LÍNEAS CELULARES		SUBPOBLACIONES CELULARES		
	NIH-3T3-G185	NIH-3T3	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
CITÓMETRO 1					
% POS	83,62±11,0	33,61±21,87	34,61±17,03	12,38±7,88	6,78±4,75
	31,62±6,27	15,17±5,64	16,82±5,75	17,87±4,97	13,91±4,96
CITÓMETRO 2					
% POS	81,28±11,32	38,04±16,48	33,03±16,15	12,32±7,1	6,29±4,60
IMFE	44,52±10,88	24,10±7,08	21,80±6,03	23,15±6,38	16,91±6,34

Los resultados están expresados como valores medios de cada uno de los parámetros indicados ± Desviación Estándar.

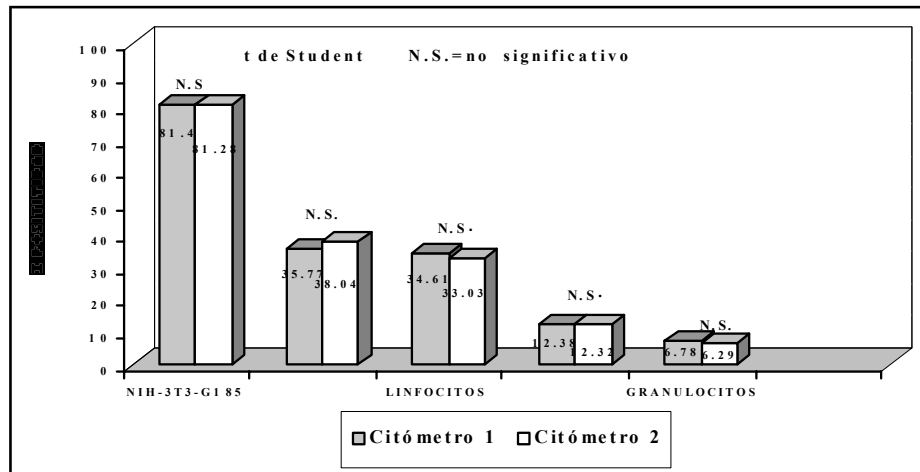


Gráfico 1. Porcentaje de Positividad (% POS) de la Gp-P en las líneas celulares de control y en las subpoblaciones celulares de sangre periférica de los individuos sanos. Valores obtenidos en dos citómetros de flujo idénticos ubicados en dos laboratorios distintos.

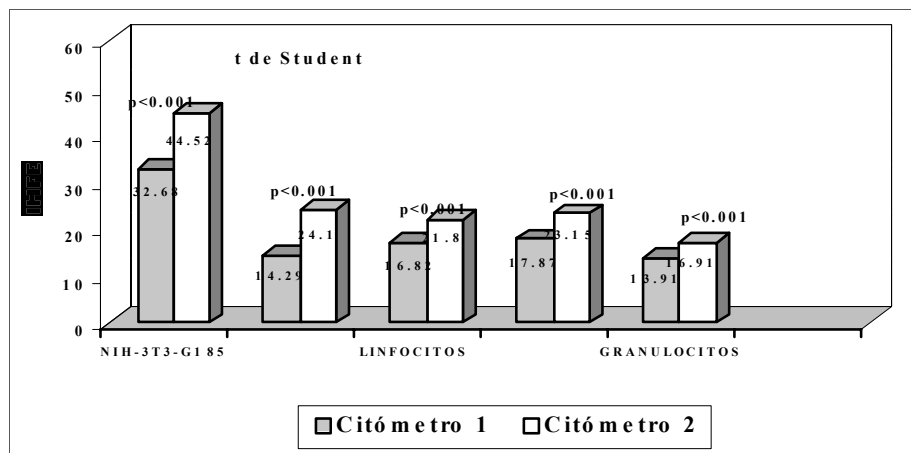


Gráfico 2. Incorporación Media de Fluorescencia Específica (IMFE) de la Gp-P de las líneas celulares control y en las subpoblaciones celulares de sangre periférica de los individuos sanos. Valores obtenidos en dos citómetros de flujo idénticos ubicados en dos laboratorios distintos.

Tabla 2. Correlación entre los porcentajes de células positivas (% POS) para la Gp-P en las subpoblaciones celulares de sangre periférica de individuos sanos, valorados paralelamente en dos citómetros de flujo idénticos.

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD (% POS)			
CITÓMETRO 2 \ CITÓMETRO 1	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
	LINFOCITOS	0,93	-
MONOCITOS	-	0,66	-
GRANULOCITOS	-	-	0,81

El análisis estadístico con el test de correlación de Pearson y Spearman mostró que los valores del porcentaje de células positivas y la IMFE para la Gp-P, en las subpoblaciones celulares de sangre periférica de los individuos sanos, los cuales fueron evaluados en dos citómetros de flujo, mantuvieron una buena correlación entre sí. En la Tabla 2 puede apreciarse que para el % POS la mejor correlación observada fue en los linfocitos ($r=0.93$), mientras que para la IMFE la correlación más alta se observó en los granulocitos ($r=0.94$) (ver Tabla 3).

Tabla 3. Correlación entre la IMFE para la Gp-P en las subpoblaciones celulares de sangre periférica de los individuos sanos, valorados paralelamente en dos citómetros de flujo idénticos.

IMFE			
CITÓMETRO 2 \ CITÓMETRO 1	LINFOCITOS	MONOCITOS	GRANULOCITOS
	LINFOCITOS	0,86	-
MONOCITOS	-	0,81	-
GRANULOCITOS	-	-	0,94

DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas que se encuentran al evaluar la expresión del gen MDR1 y la Gp-P son las diferencias que existen entre los investigadores sobre la manera de valorar los resultados. También existe una gran variedad de factores que influyen en la detección de la Gp-P en las diferentes muestras clínicas, como son la baja expresión que es el caso de los leucocitos de sangre periférica; los métodos de preparación, fijación y análisis de la muestra, la utilización de anticuerpos con especificidad variable y diferentes epítomos de reconocimiento para la Gp-P, que explicarían las diferencias observadas en las diversas publicaciones (*Beck et al, 1996*). Por estos motivos, hemos seguido las recomendaciones de consenso sugeridas en el trabajo de Beck et al, 1996, para la determinación de la Gp-P por citometría de flujo y del ARNm del gen MDR1 por RT-PCR a fin de unificar los criterios de evaluación.

Para la determinación de la expresión de Gp-P por inmunodetección, la inmunohistoquímica o la citometría de flujo (CF) han sido descritas como técnicas válidas; no así, el Western blott, por su mayor coste y complejidad, pero sobre todo por presentar tanto casos de falsos negativos, a causa de la activación proteolítica, como falsos positivos, por detectar productos proteicos de otros genes relacionados.

En nuestro caso, al trabajar tanto con células de sangre periférica como con cultivos celulares, la técnica de elección recomendada para la valoración de los niveles de expresión de la Gp-P es la citometría de flujo. Hemos empleado en la detección de la Gp-P dos citómetros de flujo, de la misma marca y modelo, ubicados en dos centros diferentes, para analizar la variabilidad que pudiera existir para una misma determinación en laboratorios distintos. Nuestros resultados indican que las determinaciones en

diferentes citómetros guardan una alta correlación estadística y que en términos relativos son superponibles las lecturas en ambos aparatos. No obstante, la diferente calibración y energía lumínica del láser de argón así como los diferentes valores de las ganancias en los fotomultiplicadores, determinan que los valores absolutos sean superiores en el CF2 (Centro Regional de Transfusión Sanguínea) que en el nuestro, CF1 (Departamento de Anatomía Patológica). A pesar de que la intensidad de expresión de la Gp-P en las células mononucleadas de sangre periférica es baja, ambos citómetros de flujo detectaron su presencia en las células. Estos resultados apoyan la posibilidad de poder determinar la expresión de la Gp-P de forma reproducible y fiable entre laboratorios si se aplican protocolos de trabajo semejantes.

El análisis de las muestras para la determinación de Gp-P debe ser hecho preferiblemente de manera inmediata o, como máximo, dentro de las 24 horas siguientes a la obtención de las mismas. En este trabajo, los ensayos se realizaron en el momento de obtener la muestra de sangre periférica por lo que no hubo demora en el procesamiento de la misma.

Con la finalidad de calibrar, validar y estandarizar los ensayos de determinación de los niveles de expresión de Gp-P, se analizaron paralelamente dichos niveles en una línea celular con fenotipo MDR que expresaba de forma mantenida y constante Gp-P, como es la línea celular fibroblástica NIH-MDR-G185, y la línea celular parental no amplificada NIH-3T3 (Beck *et al*, 1996; Beck y Grogan, 1997). Estas líneas celulares se encontraban criopreservadas a -70°C en medio de cultivo enriquecido con un 5-10% de suero bovino fetal (SBF) y un 10% de DMSO (Lehne *et al*, 1995). Nuestra experiencia en la determinación de Gp-P, en los ensayos realizados sobre estas líneas ha sido que las modificaciones de los valores obtenidos tras la criopreservación son inferiores al 5% antes y después de la misma y que los resultados son totalmente reproducibles, sin detectar cambio en la antigenicidad dentro de cada lote.

La elección del anticuerpo contra a la Gp-P es muy importante desde el punto de vista metodológico y está influenciada por diferentes factores. Nuestra experiencia en líneas celulares renales y de otras estirpes es que los mejores resultados se obtienen con el anticuerpo monoclonal JSB-1, seguido por C-494 y MRK-16. La selección del un anticuerpo conjugado con FITC fue debida al intento de conocer la expresión real de la Gp-P sin emplear técnicas de inmunocitoquímica de amplificación. También en la planificación de nuestros ensayos hemos tenido presentes las consideraciones establecidas sobre la elección de los controles para las técnicas de

inmunofluorescencia directa. Todas las determinaciones de la Gp-P incluyeron un control isotipo a igual concentración que el anticuerpo contra a Gp-P (Beck *et al*, 1996; Beck y Grogan, 1997).

Para la expresión de resultados han sido propuestas distintas posibilidades: 1) Porcentaje de células positivas (POS%): porcentaje de células positivas para cada anticuerpo primario, una vez establecida la región negativa con el control de fluorescencia inespecífica (CI) correspondiente (Kute y Quadri, 1991; Loken y Wells, 1994). 2) Incorporación media de fluorescencia específica (IMFE) de un anticuerpo establecida sobre una escala logarítmica, definida como la diferencia entre la fluorescencia total debida a la unión de un anticuerpo específico y la fluorescencia proporcionada por el control de fluorescencia inespecífica correspondiente. Constituye una estimación de la densidad antigénica de una población celular. Esta forma de expresión de la fluorescencia fue propuesta por Kute y Quadri en 1991 y empleada posteriormente también por otros autores (Rappa *et al*, 1993). Los valores suministrados se deben expresar como variables continuas, en lugar de intentar establecer un punto de corte que separe positividad de negatividad en la expresión de antígenos. En nuestra opinión la valoración de los niveles de expresión de moléculas en una población celular mediante la estimación de la IMFE permite evidenciar mucho mejor las diferencias que la POS% o que el canal medio de fluorescencia.

Los resultados obtenidos con la metodología empleada en la determinación de la Gp-P por citometría de flujo e inmunofluorescencia directa, utilizando el anticuerpo monoclonal JSB-1 marcado con FITC, permiten concluir que es una técnica reproducible y fiable para la evaluación del fenómeno MDR en las células nucleadas de sangre periférica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berar CW, et al. 1996. **Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations.** Cancer Res. Vol. 56: 3010-3020.

Beck WT, Grogan TM. 1997. **Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins.** Leukemia. Vol. 11: 1107-1109.

Chevillard S, Vielh P, Validire P, Marie JP, Faussat AM, Barbu V, Bayle C, Benard J, Bonnal C, et al. 1997. **French multicentric evaluation of mdr1 gene expression by RT-PCR in leukemia and solid tumours. Standardization of RT-PCR and preliminary comparisons between RT-PCR and immunohistochemistry in solid tumours. French**

Network of the Drug Resistance Intergroup, and Drug Resistance Network of Assistance Publique-Hopitaux de Paris. Leukemia. Vol. 11: 1095-1106.

Kute TE, Quadri Y. 1991. **Measurement of proliferation nuclear and membrane markers in tumor cells by flow cytometry.** J Histochem Cytochem. Vol. 39: 1125-1130.

Lehne G, De Angelis P, Clausen OP, Egeland T, Tsuruo T, Rugstad HE. 1995. **Binding diversity of antibodies against external and internal epitopes of multidrug resistance gene product P-glycoprotein.** Cytometry. Vol. 20: 228-237.

Loken MR, Wells DA. 1994. **Immunofluorescence of surface markers.** En: Ormerod MG, editor. Flow cytometry. A practical approach. Nueva York: Oxford University Press. P. 67-92.

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, et al. 1990. **Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction.** Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 87: 7160-7164.

O'Valle F, Aguilar D, Alvaro T, Aneiros J. 1993. **Técnicas de manipulación de cultivos tisulares.** En: García del Moral R, editor. Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid: Interamericana McGraw-Hill. P. 427-456.

Rappa G, Lorico A, Sartorelli AC. 1993. **Reversal of etoposide resistance in non-P-glycoprotein expressing multidrug resistant tumor cell lines by novobiocin.** Cancer Res. Vol. 53: 5487-5493.