



**EFFECTOS DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX EN
MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA, ANALIZADAS POR CITOMETRÍA DE
FLUJO**

DERLY MARITZA LÓPEZ PÁEZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C.

NOVIEMBRE 27 DE 2012

**EFFECTOS DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX EN
MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA, ANALIZADAS POR CITOMETRÍA DE
FLUJO**

DERLY MARITZA LÓPEZ PÁEZ

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BACTERIÓLOGA**

DIRECTORA

SANDRA MILENA QUIJANO GOMEZ MSc. PhD.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C.

2012

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución Nº 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

DEDICATORIA

Mamá siempre has estado para mí de forma incondicional por eso en esta ocasión te dedico este trabajo que es el producto del esfuerzo y ganas de salir adelante demostrando que a pesar de las adversidades cuando se quiere se puede.
¡Lo logramos!

Dedico este trabajo a Juan Esteban mi niño querido quien en tan poco tiempo me mostró que vida solo hay una y que es para disfrutarla con todo lo que contiene ya sea bueno o malo.

A uno de los grandes amores de mi vida a pesar de que ya no estés a mi lado siempre me enseñaste que por más duro que puedan ser las cosas al final todo valdrá la pena.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS y a la vida por permitir que este sueño sea una realidad.

A la doctora Sandra Quijano por brindarme su apoyo, guía y por enseñarme que el ser una excelente persona es la mejor recompensa por nuestra labor como profesionales del área de la salud.

Ser una mejor persona es gracias a lo vivido cada día, por eso le agradezco a mi mamá a mi familia y a mis amigos que todo el tiempo han estado apoyándome tanto a nivel profesional y personal.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
GLOSARIO	16
RESUMEN	21
INTRODUCCIÓN	22
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GENERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1. DEFINICIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO	24
3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO EN LA ACTUALIDAD	25
3.2.1. INDICACIONES MÉDICAS Y PANELES INMUNOFENOTÍPICOS EMPLEADOS EN LA ACTUALIDAD	25
3.3. CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEMÁS MUESTRAS DE ORIGEN BIOLÓGICO	29
3.4. SOLUCIONES ESTABILIZANTES EMPLEADAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO	30

3.4.1. DEFINICIÓN Y RECOMENDACIONES DE USO TÉCNICO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX	30
3.4.1.1. TRABAJOS DE APLICACIÓN EN CMF CON EL EMPLEO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX	31
3.4.1.1.1. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECUENTOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS	31
3.4.1.1.2. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE FSC Y SSC	32
3.4.1.1.3. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICOS	37
3.4.1.1.4. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR EN LEUCOCITOS Y GLÓBULOS ROJOS	39
3.4.1.1.5. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR DE LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS	44
3.4.1.1.6. OTROS TRABAJOS DE APLICACIÓN	47
3.4.1.1.7. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE LCR	50
3.4.2. DEFINICIÓN Y RECOMENDACIONES DE USO TÉCNICO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT	50
3.4.2.1. TRABAJOS DE APLICACIÓN EN CMF CON EL EMPLEO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT	52
3.4.2.1.1. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECUENTOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS	52
3.4.2.1.2. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECUENTOS CELULARES RELATIVOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS	54

3.4.2.1.3. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE FSC Y SSC	58
3.4.2.1.4. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICOS	58
3.4.2.1.5. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA Y MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL (UCB)	59
3.5. TRABAJOS CONJUNTOS CON LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX BCT	65
3.5.1. EFECTO DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE RECuentOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS	65
3.5.2. EFECTO DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOFENOTÍPICOS	65
4. CONCLUSIONES	69
5. BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Manifestaciones y condiciones clínicas en las cuales se deben indicar los análisis de inmunofenotipificación por CFM en casos de sospecha de una neoplasia hematológica.	26.
Tabla 2. Paneles inmunofenotípicos sugeridos para diferentes entidades neoplásicas.	27
Tabla 3. Recomendaciones de manejo de cada una de las muestras que pueden ser remitidas a los servicios de citometría.	30
Tabla 4. Indicaciones técnicas de uso del reactivo Transfix.	31
Tabla 5. Indicaciones técnicas de empleo del reactivo Cyto-Chex BCT.	51
Tabla 6. Comparación de recuentos absolutos celulares en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT después de 14 días de almacenamiento a temperaturas de incubación de 2°C a 10°C.	53
Tabla 7. Evaluación de los porcentajes de células positivas para diferentes CDs empleados en leucemias en muestras de MO sin tratar (evaluadas 6 horas post-recolección) y con Cyto-Chex BCT (evaluadas a las 72 horas post-tratamiento) a 4°C.	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura.1. Variaciones en las tasas de recuperación celular de las subpoblaciones de leucocitos en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix hasta 10 días de almacenamiento a 4 °C.	33
Figura 2. Porcentaje de recuperación de LT CD4+ en muestras de SP fijadas y no fijadas con Transfix (dilución 1/10 y 1/5) a diferentes temperaturas de incubación (25°C, 37°C y 42°C) y períodos de tiempo.	34
Figura 3. Gráficos representativos de Dot-Plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix incubadas a 4°C por 10 días.	35
Figura 4. Gráficos representativos de Dot-Plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP total y células mononucleares obtenidas mediante gradiente de Ficoll fijadas con Transfix e incubadas a temperatura ambiente y a 37°C hasta un período de 9 días.	36
Figura 5. Evaluación de SSC en las subpoblaciones de granulocitos a diferentes temperaturas de incubación (4°C, 25°C y 37°C) en muestras de SP fijadas con Transfix (diluciones 1/10 y 1/5).	37
Figura 6. Evaluación de la intensidad de fluorescencia de la molécula CD45 en las diferentes subpoblaciones de leucocitos de SP no tratadas (histograma de color negro) y fijadas con Transfix a 4°C (histogramas de color gris) y almacenadas por 10 días.	38

Figura 7. Estabilidad para la molécula CD45 y porcentaje de recuperación celular en la población de linfocitos en muestras de SP y sangre de cordón umbilical fijadas con Transfix a temperatura ambiente y monitorizada por 9 días.	40
Figura 8. Dot plots bivariados de CD3-FITC vs CD4-PE en muestras de ST y células mononucleares de SP obtenidas por separación mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) tratadas con Transfix; incubadas a 25°C y a 37°C almacenadas hasta 12 días.	41
Figura 9. Evaluación del porcentaje de células muertas o apoptóticas mediante tinción con yoduro de propidio (IP- FL3), 7 amino-actinomicina D (7- AAD) y anexina V (ANX) en muestras de ST y células mononucleares de SP obtenidas mediante separación por gradiente de densidad (Ficoll Hypaque), almacenadas hasta 15 días a 4°C.	42
Figura 10. Dot plots bivariados de FL1 vs FL3 para la evaluación de la captación supravital de IP en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix a 4°C almacenadas por 10 días.	43
Figura 11. Dot plots bivariados de ANX-FITC vs GLY-A-PE para la evaluación de la captación supravital de anexina V (ANX) en la población de glóbulos rojos no tratados y tratados con Transfix después de 2 días de almacenamiento a 4°C.	44
Figura 12. Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix a 4°C almacenadas por 10 días.	45
Figura 13. Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en muestras de ST y SP obtenidas por separación mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) tratadas con Transfix; incubadas a 25°C y a 37°C por un período de 9 días.	46
Figura 14. Análisis por microscopía electrónica barrido (SEM) en poblaciones de eritrocitos y linfocitos en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix incubadas a 4°C y almacenadas por 12 días.	47
Figura 15. Evaluación del contenido de DNA por CMF en muestras de SP (obtenidas por separación mediante gradiente de densidad Ficoll Hypaque).	48

Figura 16. Evaluación de la fragmentación del DNA por el método del TÚNEL en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix	49
Figura 17. Evaluación de los recuentos relativos en subpoblaciones de linfocitos en muestras de SP estabilizadas con Cyto-Chex BCT monitorizadas por 7 días a temperatura ambiente.	55
Figura 18. Evaluación de los recuentos celulares relativos para diferentes CDs en las poblaciones de linfocitos en muestras de SP estabilizadas con Cyto-Chex BCT monitorizadas por 7 días a temperatura ambiente.	56
Figura 19. Efectos del estabilizante Cyto-Chex BCT en muestras de SP sobre los recuentos celulares relativos en subpoblaciones celulares de leucocitos PSGL-1+ (neutrófilos, monocitos y LT CD3+) a diferentes temperaturas de incubación por un período de 7 días post-recolección.	57
Figura 20. Dot plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP tratadas con Cyto-Chex BCT y con K3EDTA incubadas temperatura ambiente por un período de 7 días.	60
Figura 21. Evaluación de IF para la expresión de CD11b en neutrófilos de SP después 0 y 4 horas de incubación ex vivo en 5 sujetos.	61
Figura 22. Evaluación de la IMF en las subpoblaciones de leucocitos en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT por un período de una semana a temperaturas de refrigeración y ambiente.	62
Figura 23. Evaluación de la IMF para la expresión de la PSGL-1 en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT almacenadas por un período de 7 días a diferentes temperaturas de incubación.	63
Figura 24. Impacto del almacenamiento sobre los recuentos celulares en muestras SP con K3EDTA incubadas a 4°C por un período de 10 días.	66
Figura 25. Evaluación de la IMF para la molécula 7-AAD en muestras de SP tratadas con Transfix y Cyto-Chex BCT	67

analizadas en diferentes puntos del tiempo por un período de 10 días a temperatura ambiente.

Figura 26. Impacto de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT en la expresión de diferentes marcadores CDs evaluados a temperatura ambiente por un período de 10 días.

68

GLOSARIO

Molécula CD	Reactividad.
CD1a	Timocitos (60%-90%), algunas subpoblaciones de células dendríticas.
CD1c	Denominado BDCA-1. Caracterizado en células dendríticas de origen mieloide.
CD2	Linfocitos, timocitos (95%-99%), subpoblaciones de monocitos que pueden ser precursores de las células dendríticas.
CD3	Linfocitos (involucrado en la expresión del TCR), timocitos (60%-85%), células de purkinje en el cerebelo.
CD4	Subpoblaciones de linfocitos T helper (CD3+CD4+), timocitos (80%-95%), timocitos (80%-95%), monocitos (en baja densidad a nivel de membrana celular) y en monocitos y macrófagos (CD3-CD4+) en citoplasma. Receptor del VIH.
CD5	Linfocitos (en SP aproximadamente el 70 % y timo).
CD7	Linfocitos T (85%-90%), precursores de linaje linfoide.
CD8	Linfocitos T citotóxicos/ supresores; subpoblaciones de células NK CD16+ (antígeno de baja densidad), linfocitos T CD57+ (antígeno de alta densidad) y en linfocitos CD8+ CD62L+.
CD9	Granulocitos (basófilos y eosinófilos), monocitos, células pre-B, linfocitos B, macrófagos, plaquetas, células T activadas.
CD10	Antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (Common acute lymphoblastic leukemia-associated, CALLA). Se encuentra en monocitos, macrófagos, granulocitos, linfocitos.

CD11b	Denominado Mac-1 o receptor del complemento 3. Se expresa en la línea granulocítica: neutrófilo, eosinófilo, basófilo, monocitos, células dendríticas mieloides, linfocitos de SP (incluyendo células NK y subpoblaciones de células T).
CD11c	Células dendríticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK (antígeno de baja densidad).
CD13	Linaje mielóide (precursores mieloides, línea granulocítica: neutrófilo, eosinófilo, basófilo), monocitos, células dendríticas mieloides.
CD14	Monocitos, se presenta baja reactividad en las subpoblaciones de granulocitos.
CD15	Granulocitos neutrófilo y eosinófilo y monocitos (antígeno de baja densidad).
CD16	Receptor Fc gamma III expresado en granulocitos, células NK y macrófagos, se encuentra en aproximadamente el 15 % de linfocitos.
CD19	Linaje B (precursores linfoides y linfocitos B).
CD20	Linfocitos B, células dendríticas foliculares en el centro germinal, subpoblaciones de células T (bajo nivel de expresión).
CD22	Linfocitos B (localización a nivel citoplasmático), linfocitos B maduros (expresión a nivel de superficie celular).
CD23	Receptor Fc épsilon II o FcεRII de baja afinidad (receptor para IgE). Se localiza en células B maduras, macrófagos activados, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas, monocitos.
CD25	Receptor de baja afinidad de la interleuquina 2 (IL-2R). Presente en células T y B activadas, algunos timocitos y precursores mieloides.
CD27	Receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Presente en linfocitos T, timocitos (a nivel medular), linfocitos B circulantes (cerca del 33%).
CD28	Presente en LT CD3+ (60%-80%), 95% en LT CD4+, 50% en LT CD8+, 5% en timocitos CD3-.
CD30	Antígeno perteneciente a la superfamilia de receptores TNFR/NGFR. Se localiza en linfocitos T, células B activadas, macrófagos así como en células NK activadas.
CD31	Molécula de adhesión en plaquetas y/o células endoteliales tipo 1 (PECAM-1), miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, el cual se localiza en células endoteliales, plaquetas, subconjuntos de linfocitos T, monocitos, granulocitos.

CD33	Linaje mielomonocítico (cuya expresión en los monocitos es fuerte y en la población de granulocitos neutrófilo, eosinófilo y basófilo es débil).
CD34	Células precursoras hematopoyéticas.
CD35	Receptor de complemento tipo 1 (CR1). Se localiza en eritrocitos, linfocitos T y B.
CD36	Conocido como receptor de la trombospondina que se localiza en plaquetas, eritrocitos, monocitos, células dendríticas.
CD38	Célula pre-B, células plasmáticas, timocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, mieloblastos, eritroblastos.
CD39	Células B maduras, células NK activadas y linfocitos T activados. También se expresa débilmente en la población de granulocitos.
CD40	Se localiza en células dendríticas, linfocitos B y macrófagos.
CD41a	Conocido como complejo dependiente de calcio (glicoproteína IIb/IIIa) el cual se expresa en plaquetas y megacariocitos.
CD42a	Conocido como glicoproteína IX cuya localización es en plaquetas activadas y en megacariocitos.
CD42b	Conocida como glicoproteína Ib. Se localiza en megacariocitos y en plaquetas.
CD43	Denominada también sialoforina, molécula que se localiza en linfocitos T, monocitos, granulocitos y en algunas poblaciones de linfocitos B.
CD44	Linfocitos (90%), monocitos, granulocitos y en bajos niveles en timocitos y eritrocitos.
CD45	Antígeno leucocitario común.
CD45RA	Miembro de la familia del antígeno CD45. Se localiza en el 50% de LT CD4+, 75% en LT CD8+, linfocitos B, células NK, linfocitos T vírgenes.
CD45RO	Linfocitos T (CD4+ y CD8+), monocitos, macrófagos, granulocitos y células T de memoria.
CD49d	Células B, LT y en la población de monocitos se expresa débilmente.
CD56	Linfocitos NK CD16+, subpoblaciones de linfocitos T activados.
CD57	Células mononucleares de sangre periférica (15-20%), subpoblaciones de células NK, LT.
CD61	Forma parte del complejo (glicoproteína IIb/IIIa), siendo esta molécula la glicoproteína IIIa. Se expresa en plaquetas activadas, megacariocitos y en algunas células de linaje mieloide y eritroide.

CD62L	Molécula denominada L-selectina, cuya localización es en linfocitos T y células T reguladoras CD4+ y CD8+ timocitos (10%).
CD64	Receptor Fc gamma I (FcγRI) de alta afinidad, expresado en monocitos, macrófagos, subpoblaciones circulantes de células dendríticas y en bajos niveles en neutrófilos polimorfonucleares.
CDw65	Células mieloides y monocitos.
CD66a	Linaje mieloide, monocitos.
CD66b	Miembro de la familia del antígeno carcinoembrionario (ACE).descrita en granulocitos neutrófilos.
CD69	Linfocitos T y B activados, células NK, plaquetas, LT CD3+ en timo.
CD71	Receptor para la transferrina. Se expresa en los precursores eritroides y en linfocitos activados.
CD79a	Denominada mb-1, la cual es expresada en linfocitos B en diferentes etapas de diferenciación (células pre-B).
CD79b	También conocida como beta- inmunoglobulina, presente en linfocitos B.
CD80	Ligando de las moléculas CD28 y CTLA-4 en linfocitos T. Se expresa en linfocitos B activados, monocitos y células dendríticas.
CD81	Proteína transmembrana tipo III (TAPA-1), que se localiza en células B y LT.
CD86	Expresado en células dendríticas, monocitos macrófagos en reposo, células B.
CD94	Receptor de lectina tipo D en linfocitos NK 1 (KLRD1), localizado en células NK, algunos linfocitos T TCR γ/δ+.
CD95	Linfocitos B, LT, células NK, monocitos, células T de memoria CD45RO+, LT γ/δ.
CD99	Conocido como MIC2, expresado en todos los leucocitos y en timocitos.
CD103	Células CD8+ intraepiteliales (95%), 40% en células T asociadas a mucosas, 2% de linfocitos de sangre periférica.
CD105	Células endoteliales angiogénicas.
CD117	Precusores mieloides, mastocitos, promielocitos.
CD123	Receptor de la cadena α de la interleuquina 3 (IL-3Rα). Expresado en subpoblaciones de células dendríticas, precusores mieloides, monocitos, eosinófilos, basófilos.
CD127	Receptor α de la interleuquina 7 (IL-7Rα). Es expresado en timocitos, progenitores de linfocitos T y B y algunas células de origen mieloide.

CD141	Conocido como BDCA-3, antígeno expresado en células dendríticas mieloides.
CD152	Antígeno asociado a linfocitos T citolíticos (CTLA-4), descrito en células B.
CD162	Denominada P-selectina glicoproteína ligando 1 (PSGL-1), localizado en neutrófilos, monocitos y linfocitos.
CD183	Se expresa en linfocitos T activados, células NK y LB Este antígeno también se le denomina CXCR3 (receptor para quimioquina tipo 3).
CD184	Receptor de quimioquina tipo 4 (CXCR-4).Se localiza en LT CD4+, CD4- y CD8+.
CD195	Llamado también receptor para quimioquina tipo 5 (CCR5) expresado en LT con fenotipo efector o memoria, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras.
CD200	Células T y B activadas, subconjuntos de células progenitoras CD34+.
CD203c	Expresión restringida a basófilos, mastocitos.
CD303	Denominado BDCA-2, antígeno que se expresa en células dendríticas plasmocitoides y en algunos linfocitos.
CD300e	Llamado IREM-2 (receptor inmune expresado en células derivadas de monocitos) que expresa en monocitos y células dendríticas de origen mieloide (mCD).
CD335	Conocido como NKp46 miembro de la familia de receptores citotóxicos naturales (NCRs) presente en células NK activadas.
CLA	Antígeno linfocitario cutáneo, presente en LT CD4+ (predominante en dermis), LT CD8+ (en epidermis).
FMC-7	Linfocitos B maduros.
FOXP3	Células T reguladoras.
Granzima	Linfocitos T CD8+.
HLA-DR	Células progenitoras hematopoyéticas, monocitos, células dendríticas, linfocitos B.
KDR	Expresado en células progenitoras endoteliales CD34+. Se conoce como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
MPO	Linaje mieloide (línea granulocítico-neutrófilo, monocitos).
Perforina	Células NK, linfocitos T CD8+.
NG2	Linfocitos B.
TCL1	Linfocitos T y B inmaduros a nivel de citoplasma.

RESUMEN

En los laboratorios de citometría de flujo (CMF) las diferentes muestras que son evaluadas de forma rutinaria son remitidas en gran parte desde lugares lejanos donde no se cuenta con la infraestructura necesaria para realizar los análisis lo que obliga a enviar las muestras por tiempos prolongados desde la toma de la muestra (horas a días) a determinadas condiciones de temperatura que en gran parte pueden afectar de forma significativa la integridad de las muestras y por lo tanto los resultados obtenidos tras su análisis. Por lo que surge la necesidad de buscar una alternativa que permita asegurar la conservación de las muestras por varios días (hasta 14 días) sin que se afecte alguna de las propiedades intrínsecas de las poblaciones celulares contenidas en ella.

Es por esto que en los últimos años varios laboratorios fabricantes de los diferentes reactivos empleados en CMF han desarrollado diferentes estabilizantes o preservantes que se emplean con diferentes muestras de origen biológico (sangre periférica, sangre de cordón umbilical, LCR, MO, etc.). Estos reactivos se conocen como Transfix (UK NEQAS) y Cyto-Chex BCT (Streck, Omaha, NE, USA) y están diseñados para proporcionar tiempos de estabilidad prolongados de las muestras después de su recolección en hasta 14 días a temperatura de refrigeración o ambiente los cuales dependen del tipo de análisis que se requiere realizar ya que se ha comprobado que no todas las temperaturas de incubación y no todos los CDs se conservan con los reactivos estabilizantes.

Así en el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de las publicaciones realizadas por diversos grupos de investigación de CMF acerca de los efectos de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BTC sobre las propiedades biológicas de diferentes poblaciones celulares, tipo de muestras analizadas y recomendaciones técnicas de uso para estudios de citometría de flujo, que sirvieron como punto de partida para determinar de manera específica qué tipo de reactivo estabilizante es el más conveniente de utilizar en cada análisis.

INTRODUCCIÓN

El análisis inmunofenotípico de las células hematopoyéticas normales y tumorales mediante el empleo de la citometría de flujo multiparamétrica (CMF), ha representado una herramienta fundamental a la hora de clasificar diferentes tipos de neoplasias hematológicas derivadas de distintos tejidos como la médula ósea, los ganglios linfáticos y otros tejidos; empleando métodos estandarizados por los servicios de citometría de distintos hospitales e instituciones a nivel nacional e internacional. Una de las variables que impactan en forma directa en los resultados de los análisis por CMF son las condiciones en que las muestras son remitidas al laboratorio clínico es decir en la fase pre-analítica, ya que no siempre cumplen con los estándares de calidad que garanticen que los reportes emitidos tras su análisis reflejen la condición clínica real del paciente. Dentro de las causas más frecuentes asociadas a muestras de mala calidad en la fase pre-analítica, se encuentra que los servicios de citometría son de alta complejidad y no todas las instituciones hospitalarias cuentan con esta tecnología por lo que muchas instituciones deben remitir los estudios a instituciones que si cuentan con este servicio y las muestras de estos pacientes no van a ser procesadas en los tiempos oportunos afectando características de las muestras como la celularidad, viabilidad, recuentos celulares absolutos y relativos así como la expresión de diferentes moléculas. Por esta razón, en la última década se ha implementado en los servicios de citometría el empleo de soluciones estabilizantes disponibles a nivel comercial que preservan las muestras hasta en un período de tiempo superior a una semana después de su recolección garantizando que muchos de los marcadores inmunofenotípicos y parámetros celulares que se identifican por CMF reflejen de manera directa la condición clínica real de cada paciente. (1).

1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

A nivel clínico como parte del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diferentes patologías es de gran utilidad la realización de múltiples pruebas de laboratorio especializadas que permitan evaluar el estado real del paciente en condiciones normales o patológicas. En los últimos años una de las herramientas que han cobrado gran importancia a nivel clínico es la CMF, la cual aporta respecto a otras técnicas de análisis celular, una gran objetividad, sensibilidad, especificidad y rapidez que permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de un gran número de parámetros de cada una de las células que se analizan, como tipo de célula, cantidad de células presentes, estadio madurativo, fenotipos aberrantes, etc (2).

Dentro de las ventajas del empleo de la CMF se encuentra el estudio de diversos tipos de muestras biológicas como médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y de muestras especiales como biopsias de tejido, punciones de ganglio y líquidos

corporales (líquido pleural, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo) entre otras (1); por lo cual es de vital importancia implementar un control de calidad en la fase pre-analítica el cual está directamente relacionado con el tipo de muestra, la calidad de la misma, el período comprendido entre su obtención, transporte y procesamiento en el laboratorio, ya que estas variables impactan de forma relevante en la celularidad de las muestras, su viabilidad y en la integridad de las proteínas expresadas a nivel de superficie celular o intracelular. Algunas de estas muestras deben ser procesadas en períodos máximos de 24 horas (en particular MO y SP) pero otras muestras pueden sufrir mayor daño relacionado con el tiempo posterior a su obtención reportándose porcentajes de muerte celular superiores al 80% en períodos cortos de tiempo como es el caso del líquido cefalorraquídeo (LCR) (1). Otro factor de gran relevancia que impacta de forma directa en la calidad de las muestras para CMF y por ende en el diagnóstico del paciente, es la distancia entre el hospital o consultorio donde se obtiene la muestra y el laboratorio de referencia de citometría principalmente en ciudades o municipios que no cuentan con la infraestructura necesaria para el análisis de las muestras debido a problemas en las economías locales, por falta de consultas clínicas especializadas y por falta de personal capacitado en CMF obligando a estos centros a remitir las muestras a los laboratorios de referencia a grandes distancias (horas a días), sumado a los múltiples trámites administrativos afectando la calidad de los análisis (3).

Con el fin de superar estos inconvenientes y lograr muestras de calidad desde la fase pre-analítica durante la última década se ha venido implementando en los laboratorios de citometría soluciones estabilizantes disponibles a nivel comercial dentro de las que se encuentran Transfix y Cyto-Chex BCT. Distintos trabajos han descrito que muestras de SP tratadas con estos estabilizantes después de ser obtenidas y evaluadas en diferentes tiempos, muestran una mayor viabilidad celular, con mantenimiento de las estructuras celulares, proporcionando resultados más seguros y confiables que reflejan de forma directa la condición clínica real del paciente. A pesar que la aplicación clínica de estos estabilizantes ya está reportada en estos trabajos, no existe un consenso general entre los servicios de citometría de cómo implementar el uso de estos estabilizantes en la rutina clínica de los laboratorios y no hay estudios más amplios en muestras diferentes a la SP y LCR. Por lo que en el presente trabajo se realizó una revisión de la literatura acerca de los estabilizantes más utilizados en citometría, sus efectos en las propiedades biológicas de diferentes poblaciones celulares, tipos de muestras analizadas y recomendaciones técnicas de uso. Esta revisión será de gran utilidad para la difusión del uso y ventajas de los estabilizantes entre los servicios de citometría y como punto de referencia para determinar qué tipo de análisis se debe realizar con cada sustancia estabilizante, así como que tipo de muestras pueden ser analizadas con estos preservantes ya que no existen trabajos en muestras diferentes a SP ó LCR lo que sugiere que se tiene que empezar a trabajar en el análisis de los mismos parámetros determinados en SP para evaluar si se

implementa como parte de la rutina clínica para el análisis de diversas muestras biológicas (como MO, entre otras, etc.).

1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Ante el marco conceptual previamente descrito, en el presente trabajo nos planteamos ¿Cuáles son los efectos de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT sobre las propiedades biológicas de las poblaciones celulares (como morfología celular, el inmunofenotipo, recuentos absolutos, recuentos relativos y viabilidad) en muestras de SP o en otras muestras biológicas analizadas por citometría de flujo en un período de hasta una semana después de su recolección?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Describir los efectos de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT sobre las propiedades biológicas de diferentes poblaciones celulares, tipo de muestras analizadas y recomendaciones técnicas de uso para estudios de citometría de flujo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los efectos de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT sobre las propiedades biológicas de las poblaciones celulares (recuentos celulares absolutos y relativos, inmunofenotipo, viabilidad, etc.) en muestras de sangre periférica analizadas por citometría de flujo.
- Describir las recomendaciones técnicas del uso del Transfix y Cyto-Chex en la fase pre-analítica en citometría de flujo (temperatura, tiempo, volumen, etc.).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. DEFINICIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La CMF es una técnica que evalúa diferentes características celulares de forma individual en donde la capacidad de proporcionar datos correlacionados a partir del análisis de elementos individuales, único en esta técnica, permite identificar poblaciones diferentes en una muestra. Esta técnica se fundamenta en hacer pasar células u otras partículas en suspensión, alineadas y de en una en una delante de un haz luminoso. La interacción de las células o partículas con el rayo luminoso genera señales que son captadas por detectores adecuados, en donde la información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz que permite determinar el tamaño (representado por la dispersión de la luz en un ángulo cónico pequeño que

coincide con la dirección de la luz incidente), por lo que es denominada FSC (*Forward Scatter*) y la complejidad (representada por la luz dispersada en ángulo recto), la cual es conocida como SSC (*Side Scatter*) y la relacionada con la emisión de luz por fluorocromos presentes en la células o la partícula al ser excitados por un rayo luminoso. Es por esto que el uso de diversos fluorocromos, cada uno con longitudes de onda de excitación similares y diferentes longitudes de onda de emisión (o "colores"), permite la evaluación de múltiples propiedades celulares de manera simultánea (2,4). En la actualidad los servicios de citometría aplican en la rutina clínica combinaciones de múltiples anticuerpos monoclonales conjugados con diversos tipos de fluorocromos, como combinaciones entre 6-8 fluorescencias distintas estandarizadas por grupos expertos, como el grupo Euroflow (5).

3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO EN LA ACTUALIDAD

La CMF es una de las técnicas que a nivel hospitalario es empleada en diversas entidades clínicas, ya que gracias a su alta especificidad y sensibilidad contribuye de manera fundamental en el diagnóstico, pronóstico, clasificación y monitorización de respuesta a tratamiento en pacientes con inmunodeficiencias primarias y adquiridas (pacientes VIH+), pacientes con diagnóstico de neoplasias hematológicas, pacientes sometidos a quimioterapia, pacientes post-trasplante, etc. Por lo que esta herramienta es para los clínicos de gran ayuda para la evaluación y valoración de cada uno de sus pacientes. Es por esto que en la actualidad el personal de salud (médicos especialistas, bacteriólogos especialistas y bacteriólogos con formación de post-grado en esta área) en los servicios de citometría deben contar con la capacitación acerca de todas las implicaciones que tiene la utilización de la CMF en las indicaciones médicas, estrategias de procesamiento de las muestras, tipo de paneles inmunofenotípicos empleados, estrategias de análisis, criterios y algoritmos diagnósticos sugeridos por grupos consenso, etc. Todas estas variables en conjunto y si se aplican de forma adecuada por un grupo que cuenta con el recurso humano apropiado hacen que la CFM sea una de las mejores herramientas en el laboratorio clínico (6 ,7).

3.2.1. INDICACIONES MÉDICAS Y PANELES INMUNOFENOTÍPICOS EMPLEADOS EN LA ACTUALIDAD

Las indicaciones médicas para la realización de estudios por CMF implica un conocimiento previo de los antígenos y parámetros biológicos y clínicos relevantes en las diferentes entidades clínicas (hematológicas, no hematológicas, etc.) ya que con su detección se puede realizar diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de una entidad clínica; por eso es de vital importancia la identificación por parte del clínico de los signos y síntomas típicos en cada paciente distinguiendo cuales de estos pueden ser sugestivos de una enfermedad más compleja que requiera estudio por CMF para la inmunofenotipificación de diversas poblaciones celulares. En la tabla 1 se presentan las manifestaciones y algunas

condiciones clínicas en las cuales se deben indicar los análisis de inmunofenotipificación por CMF, para la identificación de una neoplasia hematológica. (7).

Tabla 1. Manifestaciones y condiciones clínicas en las cuales se deben indicar los análisis de inmunofenotipificación por CFM en casos de sospecha de una neoplasia hematológica (7).

Manifestación Clínica y/o Condición Clínica	Indicaciones Generales
Citopenias: Anemia, leucopenia, y/o trombocitopenia Monocitopenia	<ul style="list-style-type: none"> • Cualquier neoplasia hematolinfóide puede cursar con diferentes grados de citopenias en conjunto con cambios displásicos. En este sentido, además del análisis morfológico es indispensable evaluar mediante CMF los linajes celulares involucrados, los fenotipos aberrantes, descartar o confirmar una leucemia aguda u otra neoplasia hematológica • Signo específico de diferentes neoplasias hematolinfoides
Leucocitosis Monocitosis Eosinofilia Leucocitosis con Neutrofilia	<ul style="list-style-type: none"> • Signo sugestivo de una neoplasia hematológica, que se debe diferenciar de condiciones reactivas o procesos infecciosos, observada en SLPC, etc. • Puede ser indicativo de LMM o ocasionalmente de un DMP en donde los análisis por CFM pueden ayudar a diferenciar de un monocitosis reactiva • Indicativo de LMA, mastocitosis, LLA, desórdenes linfoproliferativos T, síndrome hiper eosinofílico, etc. • No es indicativo de realización de inmunofenotipificación por CMF, en casos de ausencia de blastos en SP
Policitemia, trombocitopenia, trombocitosis y/o basofilia	<ul style="list-style-type: none"> • En la actualidad se realiza CMF en estos casos cuando se sospecha de un síndrome mieloproliferativo crónico
Presencia de organomegalías y masas tisulares	<ul style="list-style-type: none"> • En caso de presentación de linfadenopatías, organomegalías (incluyendo hepatomegalia y esplenomegalia) e infiltración por células tumorales (en piel, mucosas, tejido óseo, etc.)
Presencia de células atípicas y /o blastos en SP o MO	<ul style="list-style-type: none"> • Se debe realizar estudio por CMF, para realizar el diagnóstico y clasificación en los casos de LA
Presencia de células mononucleares atípicas en fluidos corporales (LCR, líquido pleural, humor vítreo o acuoso, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Se sugiere análisis por CMF para confirmar o descartar origen tumoral en casos de historia previa de una neoplasia hematológica

SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico; LMM: leucemia mielomonocítica; DMP: desorden mieloproliferativo; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; LA: leucemia aguda.

De esta manera, la determinación de qué tipo de reactivos y paneles son empleados para el análisis de cada una de las muestras depende de distintas variables como la historia clínica del paciente (que involucra resultados previos de exámenes paraclínicos) los cuales le puedan indicar al médico tratante el empleo de la inmunofenotipificación, evaluación morfológica previa y/o concomitante de la muestra (la cual es de gran utilidad a la hora de la selección de los paneles de screening o tamizaje, ya que permite realizar una primera aproximación acerca de cambios displásicos que pueden observarse en las diferentes poblaciones celulares analizadas y sirve de punto de referencia en el control de calidad interno de los diversos análisis realizados por CMF), estudios genéticos e inmunofenotípicos previos, etc. En este sentido, el análisis morfológico es esencial para el diagnóstico y seguimiento de tumores de origen hematológico y la

información que brinda la morfología debe ser complementada con los estudios de CMF y los estudios moleculares, tal como lo describe la clasificación de neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud en el año 2008 (8).

A pesar que la morfología es una técnica de alta especificidad en algunos casos la sensibilidad puede ser baja principalmente en muestras biológicas que tienen muy bajos porcentajes de infiltración tumoral o en muestras especiales con baja viabilidad y concentración celular como el LCR (9,10). En estos casos concretos la información proporcionada por CMF incrementa de forma significativa la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los análisis y de esta manera garantiza que los resultados emitidos mediante esta herramienta reflejan el estado clínico real del paciente (11).

De esta forma teniendo en cuenta las recomendaciones por el grupo EGIL (grupo europeo para la caracterización inmunológica de leucemias agudas) y en la actualidad por el grupo Euroflow (consorcio científico Europeo de empresas y grupos de investigación cuyo objetivo es el desarrollo y la estandarización de los test altamente sensibles, precisos y rápidos de citometría de flujo) han publicado listados de paneles para la inmunofenotipificación de las diversas entidades hematológicas, para la realización de pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias cuando son necesarias en la confirmación del diagnóstico de una patología. En la tabla 2 se resumen el listado de reactivos empleados para la inmunofenotipificación por CMF (1, 12).

Tabla 2. Paneles inmunofenotípicos sugeridos para diferentes entidades neoplásicas (1, 5, 12, 13, 14, 15).

Linaje	Reactivos	Indicaciones Generales
Panel de screening en LA	• CyMPO, CyCD3, CD19, CyCD79a, SmCD3, CD45, CD34, CD7	• Panel de screening en LA
Panel de screening linfoide	• CD20/CD4, CD45, CD8/Smlg λ, CD56/Smlgk, CD5, CD19/TCRγδ, SmCD3, CD38	• Tubo de screening linfoide
Panel para muestras pequeñas	• CD20, CD45, CD8/Smlgλ, CD56/Smlgk, CD4, CD19, SmCD3/CD14, CD38	• Para muestras pequeñas como material de biopsia de humor vítreo, LCR, etc.
Panel de desórdenes de células plasmáticas / (PCD)	• CD45, CD138, CD38, CD56, β2-micro, CD19, Cylgk Cylgλ • CD45, CD138, CD38, CD28, CD27, CD19, CD117, CD81	• Empleado para la detección de células clonales y aberrantes • Útil en la caracterización complementaria fenotípica y evaluación de marcadores con potencial impacto pronóstico
Panel para leucemia linfoide aguda de precursores de células B. (LLA-BCP)	• CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34; CD19; CD10, CD38 • Smlgk, CD45, Cylgμ, CD33, CD34, CD19, Smlgμ/CD117, Smlgλ • CD9, CD45, NuTdT, CD13, CD34, CD19, CD22, CD24 • CD21, CD45, CD15/CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123, CD81	• Utilizado para diagnóstico y clasificación de LLA-BCP, detección de marcadores de LAP y la detección de fenotipos asociados con aberraciones moleculares • Empleado para el diagnóstico y clasificación de LLA-BCP • Diagnóstico y clasificación de LLA-BCP, detección de fenotipos asociados con aberraciones moleculares. y detección de marcadores de LAP • Subclasificación de LLA-BCP, detección de marcadores de LAP y detección de fenotipos asociados con aberraciones moleculares

Tabla 2. Paneles inmunofenotípicos sugeridos para diferentes entidades neoplásicas (1, 5, 12, 13, 14, 15).

<p>Panel para leucemia linfoide aguda tipo T. (LLA-T)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CyCD3, CD45, NuTdT, CD99, CD5, CD10, CD1a, SmCD3 • CyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7, SmCD3 • CyCD3, CD45, TCR$\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, CD33, CD56, CyTCRβ, SmCD3 • CyCD3, CD45, CD44, CD13, HLA-DR, CD45RA, CD123, SmCD3 	<ul style="list-style-type: none"> • Empleado en el diagnóstico, clasificación en LLA-T y determinación de estadio de maduración e identificación de marcadores de LAP • Empleado en el diagnóstico, clasificación en LLA-T y determinación de estadio de maduración e identificación de marcadores de LAP • Diagnóstico en casos de LLA-T y determinación de estadio de maduración e identificación de marcadores de LAP. • Subclasificación de una LLA-T
<p>Panel para síndrome mielodisplásico / leucemia mieloide aguda. (SMD / LMA)</p>	<p>a. LMA/SMD.</p> <ul style="list-style-type: none"> • HLA-DR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b, CD10 • HLA-DR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, IREM, CD14 • HLA-DR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33, CD71 • HLA-DR, CD45, NuTdT, CD56, CD34, CD117, CD7, CD19 <p>b.LMA</p> <ul style="list-style-type: none"> • HLA-DR, CD45, CD15, NG2, CD34, CD117, CD22, CD38 • HLA-DR, CD45, CD42a/CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123, CD4 <p>c.LMA-M7</p> <ul style="list-style-type: none"> • HLA-DR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b, CD9 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico y subclasificación de LMA, HPN maduración neutrofílica • Diagnóstico y subclasificación de LMA, HPN maduración monocítica • Diagnóstico y subclasificación de LMA, HPN maduración eritroide • Expresión aberrante asociada a marcadores linfoides y maduración linfoide anormal • Expresión aberrante de marcadores y detección de células stem • Diagnóstico y subclasificación de LMA y detección de células de linaje megacariocítico, basofílico • Caracterización de LMA-M7 y mastocitosis
<p>Panel de desordenes linfoproliferativos crónicos B. (DLPC-B)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CD20/CD14, CD45, CD8/Smlgλ, CD56/Smlgk, CD5, CD19/ TCR$\gamma\delta$, SmCD3, CD38 • CD20, CD45, CD23, CD10, CD79b, CD19, C200, CD43 • CD20, CD45, CD31, LAIR1, CD11c, CD19, Smlgμ, CD81 • CD20, CD45, CD103, CD95, CD22, CD19, CXCR5, C49d • CD20, CD45, CD62L, CD39, HLA-DR, CD19, CXCR5, CD27 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de DLPC-B • Identificación de LLC vs otro caso de DLPC-B • Subclasificación de DLPC-B (LPL, MCL, MZL, etc.)
<p>Panel de desordenes linfoproliferativos crónicos B (DLPC-B)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CD20/CD4, CD45, CD8/Smlgλ, CD56/Smlgk, CD5, CD19/ TCR$\gamma\delta$, SmCD3, CD38 • CD20, CD45, CD23, CD10, CD79b, CD19, C200, CD43. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de DLPC-B • Identificación de LLC vs otro caso de DLPC-B
<p>Panel de desordenes linfoproliferativos crónicos T (DLPC-T)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CD4, CD45, CD7, CD26, SmCD3, CD2, CD28, CD8 • CD4, CD45, CD27, CCR7, SmCD3, CD45RO, CD45RA, CD8 • CD4, CD45, CD5, CD25, SmCD3, HLA-DR, CyTCL1, CD8 • CD4, CD45, CD57, CD30, SmCD3, CD11c, CD8 • CD4, CD45, CyPerforina, CyGranzima, SmCD3, CD16, CD94, CD8 • CD4, CD45, CD279, SmCD3, CD8 	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterización fenotípica e identificación del síndrome de sézary • Caracterización fenotípica . Evaluación de estadio de maduración • Caracterización fenotípica e identificación de LPL-T • Caracterización fenotípica, fenotipo citotóxico e identificación de linfoma de células T. • Caracterización fenotípica e identificación de LGL-T • Identificación de linfomas derivados de células T helper foliculares

Tabla 2. Paneles inmunofenotípicos sugeridos para diferentes entidades neoplásicas (1, 5, 12, 13, 14, 15).

Panel de desordenes linfoproliferativos crónicos células NK (DLPC-NK)	<ul style="list-style-type: none"> • CD2, CD45, CD7, CD26, SmCD3, CD56, CD5, CD19 • CD16, CD45, CD57, CD25, SmCD3, CD56, CD11c, CD19 • HLA-DR, CD45, CyPerforina, CyGranzima, SmCD3, CD56, CD94, CD19 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de fenotipo de células aberrantes tipo NK • Detección de fenotipo de células aberrantes tipo NK • Detección de fenotipo de células aberrantes tipo NK e identificación de fenotipo citotóxico efector
Espondiloartropatías seronegativas	HLA-B27	Es un marcador diagnóstico
Inmunodeficiencias Adquiridas VIH/SIDA	CD4, CD8	Evaluación de recuentos absolutos y relativos

Abreviaturas: LA: leucemia aguda, LLA-BCP: leucemia linfoide aguda de células precursoras tipo B, LAP: leucemia asociada a fenotipos, LLA-T: leucemia linfoide aguda tipo T, LMA: leucemia mieloide aguda, HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna, DLPC-B: desórdenes linfoproliferativos crónicos B; LPL: linfoma linfoplasmacítico, MCL: linfoma de células del manto, MZL: linfoma de zona marginal, LPL-T: leucemia prolinfocítica de células T.LGL: leucemia prolinfocítica largo granular; Células NK: células natural killer.

3.3. CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEMÁS MUESTRAS DE ORIGEN BIOLÓGICO

La confiabilidad de los resultados emitidos tras un análisis de inmunofenotipificación depende en gran parte del tipo de la muestra empleada, así como de las condiciones en que esta es remitida a los servicios de citometría; ya que en gran parte de los errores resultantes de estas pruebas radican en que las muestras no cumplen las condiciones adecuadas para su posterior análisis. Para el procesamiento de los diversos tipos de muestras en los laboratorios clínicos se tienen establecidos protocolos acordados previamente en diferentes consensos de expertos en el área, los cuales se centran en establecer el tipo de muestra que se debe recolectar (MO, SP, LCR, biopsias etc.) según la pregunta clínica, el tiempo máximo de procesamiento así como el empleo de algún tipo de anticoagulante para su recolección, el uso de alguna solución de transporte, lavados, centrifugación y el empleo de una solución estabilizante que se emplea en los casos donde las muestras son remitidas desde laboratorios de baja o mediana complejidad que no cuenten con la tecnología para analizarlas por CMF, lo cual garantizará que los resultados reportados son clínicamente confiables. En la tabla 3 se presentan las recomendaciones de manejo de cada una de las muestras que pueden ser remitidas a los servicios de citometría descritas en el consenso colombiano de citometría de flujo publicado en el año 2010 (1).

Tabla 3. Recomendaciones de manejo de cada una de las muestras que pueden ser remitidas a los servicios de citometría.

Tipo de muestra	Tiempo**	Lavados	Estabilizantes	Centrifugación	Anticoagulantes	SS/PBS transporte*
Sangre periférica** *	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Médula ósea	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Sangre de cordón umbilical	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Productos de leucoféresis	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Biopsias de tejidos sólidos***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Punciones de tejidos sólidos (PAAF)***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Líquido cefalorraquídeo (LCR)	30 minutos (sin estabilizar)	Sí	Sí****	Sí (máximo dos pasos)	EDTA	No
Otros fluidos corporales***	60 minutos	Sí	Sí	Sí	EDTA	Sí

* SS (solución salina) o PBS (phosphate buffered saline) para transporte.

** Tiempo máximo comprendido entre la obtención, transporte y procesamiento de la muestra. En el caso de muestras de líquido cefalorraquídeo, si no es posible procesarlas en un tiempo inferior a 30 minutos, se recomienda el uso de estabilizantes.

*** Las muestras pueden ser estabilizadas si se requiere confirmar estudios posteriores que no pueden ser practicados durante el tiempo máximo de procesamiento.

**** Estudios recientes (22,39) demuestran que el empleo de una solución estabilizante previene la pérdida celular debida a los efectos citotóxicos in vitro del líquido cefalorraquídeo sobre los leucocitos, manteniéndose la eficacia de la estabilización por periodos superiores a las 24-48 horas de su obtención.

Tomado de: Saavedra C, et al. Biomédica 2010.

3.4. SOLUCIONES ESTABILIZANTES EMPLEADAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

3.4.1. DEFINICIÓN Y RECOMENDACIONES DE USO TÉCNICO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX

Transfix es una solución estabilizante patentada, desarrollada por científicos del UK NEQAS (Programa nacional del Reino Unido para la evaluación externa de calidad) y distribuido bajo la licencia de Cytomark Ltda. Empleada en el transporte y procesamiento de diferentes muestras de origen biológico (sangre periférica, médula ósea y LCR). Cuyo efecto es el de preservar los diversos perfiles inmunofenotípicos en las poblaciones celulares inhibiendo el proceso de degradación proteolítica (observado después de un período de 36 horas de recolectada la muestra). Así mismo este reactivo permite la conservación de propiedades celulares como viabilidad celular, morfología celular reportada en linfocitos, recuentos celulares absolutos y relativos, por un período de hasta 10 días. Para el empleo del reactivo estabilizante, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. En la tabla 4 se especifican las indicaciones técnicas de uso.

Tabla 4. Indicaciones técnicas de uso del reactivo Transfix.

Variable	Indicaciones técnicas de empleo
Presentación del reactivo (cantidad en (ml) de reactivo por (ml) de muestra)*	Tubos de 0.6 ml de Transfix para 3 ml de muestra (en una relación de 0.2 ml de reactivo por 1 ml de SP y/o MO) Tubos de 0.2 ml de Transfix para 3 ml de LCR
Aspecto físico del reactivo	Líquido transparente de color verde pálido
Condiciones de almacenamiento del reactivo antes de su utilización	Se recomienda almacenar a temperatura ambiente (18- 24 °C) No almacenarse a 4°C ni congelarse
Indicios de deterioro del reactivo	Fecha de caducidad indicada en el reactivo este fuera de tiempo. Turbidez del reactivo (la cual puede ser comparada con el aspecto físico inicial del reactivo)
Tipo de muestra	Se puede emplear en muestras de SP, sangre de cordón umbilical, LCR y MO
Tipo de anticoagulante empleado	El Transfix puede ser empleado con todos los anticoagulantes de uso común (K3EDTA, citrato de sodio, etc.)
Dilución recomendada de empleo.	Dilución 1/10 o 1/5**
Condiciones de almacenamiento (reactivo y muestra)***	<ul style="list-style-type: none"> • 4°C: La muestra es viable hasta por 10 días después de su recolección • 18-24 °C: Preservación hasta 7 días después de su recolección • 37 °C: Estabilidad hasta 3 días
Tipo de análisis que se pueden realizar	Inmunofenotipificación por CMF en pacientes con HIV/SIDA y con leucemias para el estudio de diversos CD**** Recuentos celulares absolutos de LT CD4+ en pacientes HIV/SIDA. Evaluación de morfología, viabilidad, contenido de DNA, dispersión de la luz (por FSC y SSC)
Otros	En caso de muestras HIV positivas se ha observado que el estabilizante puede reducir la tasa de replicación del virus , por lo cual se recomienda su empleo en estos casos El reactivo puede preservar líneas celulares***** El reactivo puede ser empleado en muestras que van a ser analizadas por PCR***** En el caso de recuentos celulares los resultados de las muestras deben ser divididas por 0,8 para ajustes del factor de dilución

* Variaciones en las concentraciones del estabilizante Transfix puede modificar el período máximo de estabilidad de la muestra.

** La dilución recomendada por el fabricante es 1/10 para muestras de SP y MO; pero en casos como las muestras de LCR la dilución propuesta es de 1/5 (6).

*** En el caso de análisis de inmunofenotipificación para antígenos intracelulares; por los procesos de permeabilización de membrana este tipo de antígenos solo son estables hasta 3 días después de la adición del Transfix.

**** CD: Clúster de diferenciación celular.

***** Se ha observado que esta aplicación es de gran utilidad pero se debe determinar la dilución óptima que se debe emplear para la construcción de la curva de concentración.

***** En este tipo de casos la concentración óptima del Transfix debe ser definida.

3.4.1.1. TRABAJOS DE APLICACIÓN EN CMF CON EL EMPLEO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX

3.4.1.1.1 EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECuentOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS

Diversos trabajos por grupos de investigación en CMF en los últimos años se han centrado en la evaluación de los efectos del estabilizante Transfix en muestras de SP en la enumeración de recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ (LT CD4+), para la monitorización del estado inmune y de la terapia anti-retroviral de pacientes HIV+. De forma particular se han descrito varios trabajos en muestras

no tratadas, fijadas con Transfix y en preparaciones comerciales estabilizadas (empleadas en los programas de aseguramiento de la calidad para la inmunofenotipificación de subpoblaciones de linfocitos T diseñadas para imitar las propiedades de las muestras de SP). Así en las muestras de SP se observa a diversas temperaturas (4°C, 25°C, 37°C y 42°C), tiempos de almacenamiento (0, 3, 4, 7, 10 días) y diferentes diluciones (1/5 o 1/10), que los recuentos celulares de la población de linfocitos y subpoblación de LT CD4+ son estables a (4°C y 25°C) (Figura 1A y Figura 2) (16), en menor grado a 37°C, pero que en el caso de temperatura de almacenamiento de 42°C puede ser tolerada por cortos períodos de tiempo en donde se ha observado una recuperación muy leve de cerca del 63.3% de la población celular cuando esta es diluida a una concentración de 1/5 (Figura 2) (17). Efectos similares fueron encontrados en las preparaciones celulares comerciales estabilizadas cuando estas fueron almacenadas a (4°C y 22°C) hasta por 10 días y a 37°C el efecto de preservación observado fue de 2 a 4 días de incubación de las muestras en una dilución 1/10 (18). Además en el análisis de recuentos celulares absolutos en la población de monocitos y granulocitos se evidenciaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con Transfix (con recuentos celulares similares a los de las muestras frescas al día 0) comparadas con las muestras sin tratar (con valores de $p < 0,05$) evidenciados después de 10 días de almacenamiento cuando estas son incubadas a 4°C (Figura 1B y Figura 1C) (16).

3.4.1.1.2. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE FSC Y SSC

El tratamiento de las muestras de SP con Transfix provoca una alteración en las propiedades de dispersión de la luz (1 o 2 días después) con respecto a las muestras frescas, evidenciada en la población de granulocitos neutrófilos y monocitos (con FSC y SSC bajos después de 10 días de almacenamiento a diferentes temperaturas de incubación 4°C, 25°C y 37°C) (Figuras 3F y 4C-F), sugiriendo que las células de linaje mielomonocítico no solo muestran la más alta sensibilidad cuando estas son tratadas con el estabilizante sino que esta es dependiente del tiempo. Estas observaciones se realizaron a diferentes temperaturas de incubación durante 9 días tanto en muestras de sangre total y en muestras separadas mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque), en donde la población de linfocitos preserva con el paso del tiempo características homogéneas de FSC y SSC cuando son almacenadas a (4°C y 25°C) (Figuras 3F y 4C-D) (16,19). Por el contrario, en las poblaciones de eosinófilos y basófilos se puede resaltar un incremento en el SSC a diferentes temperaturas de almacenamiento con una disminución general del FSC cuando las muestras son diluidas a diferentes concentraciones 1/5 y 1/10 (Figura 5) (19).

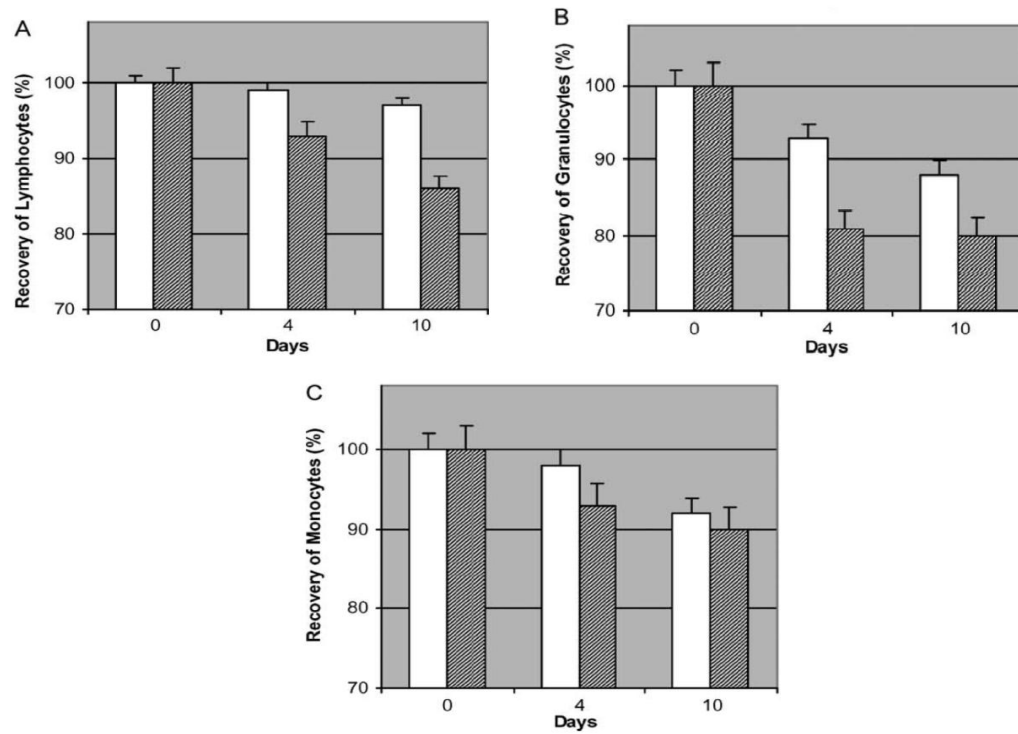


Figura.1. Variaciones en las tasas de recuperación celular de las subpoblaciones de leucocitos en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix hasta 10 días de almacenamiento a 4 °C. Los valores representados en porcentajes son comparados con los recuentos absolutos celulares al día 0 como 100%. La tasa de recuperación celular de las distintas subpoblaciones de linfocitos, granulocitos y monocitos (A, B y C, respectivamente) fue superior en las muestras fijadas con Transfix (barras de color blanco), siendo este porcentaje significativamente mayor en el periodo de 10 días de evaluación ($p < 0,05$) respecto a las muestras no tratadas (barras de color gris). Tomado de: Canonico B et al. J Immunol Methods 2004.

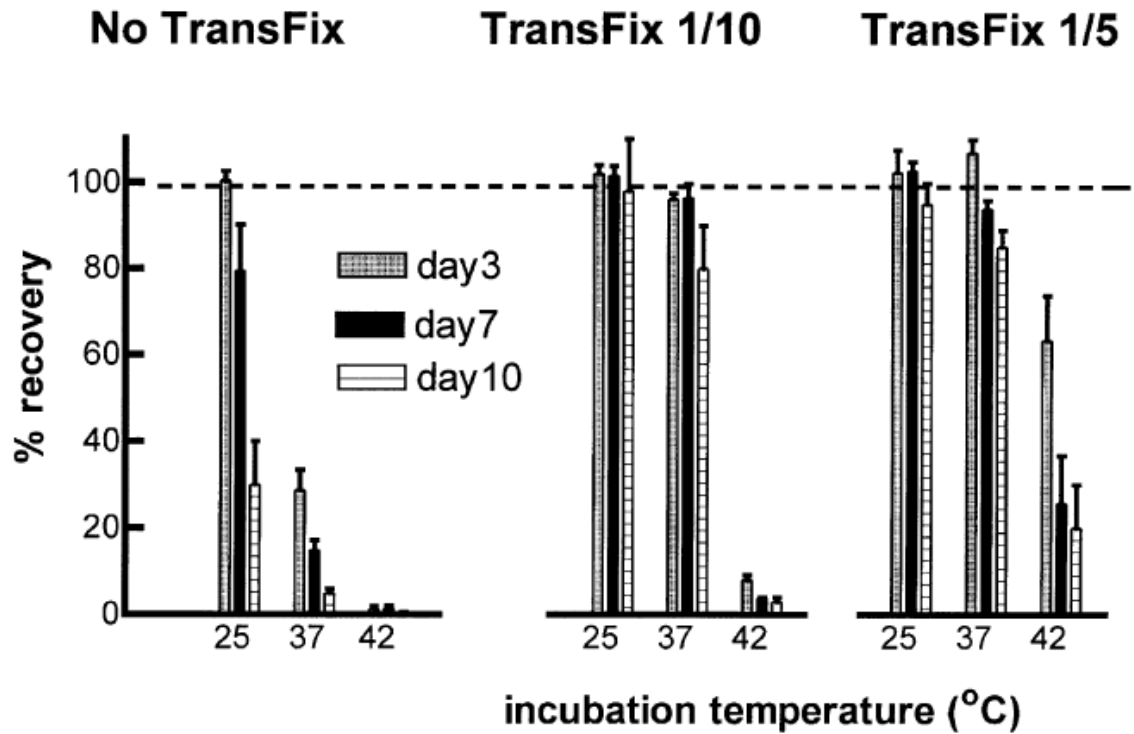


Figura 2. Porcentaje de recuperación de LT CD4+ en muestras de SP fijadas y no fijadas con Transfix (dilución 1/10 y 1/5) a diferentes temperaturas de incubación (25°C, 37°C y 42°C) y períodos de tiempo (3, 7 y 10 días). La fijación con Transfix se asocia a un alto porcentaje de recuperación de LT CD4+ al incubar las muestras a 25 y 37°C. De forma particular, el Transfix diluido 1/5 muestra una mayor tasa de recuperación celular al día 3 en comparación con el Transfix 1/10. Por el contrario las muestras sin fijador, muestran una disminución significativa del % de LT CD4+, que se pierden de forma gradual con el tiempo y a las temperaturas evaluadas. Tomado de: Jani IV et al. J Immunol Methods. 2001.

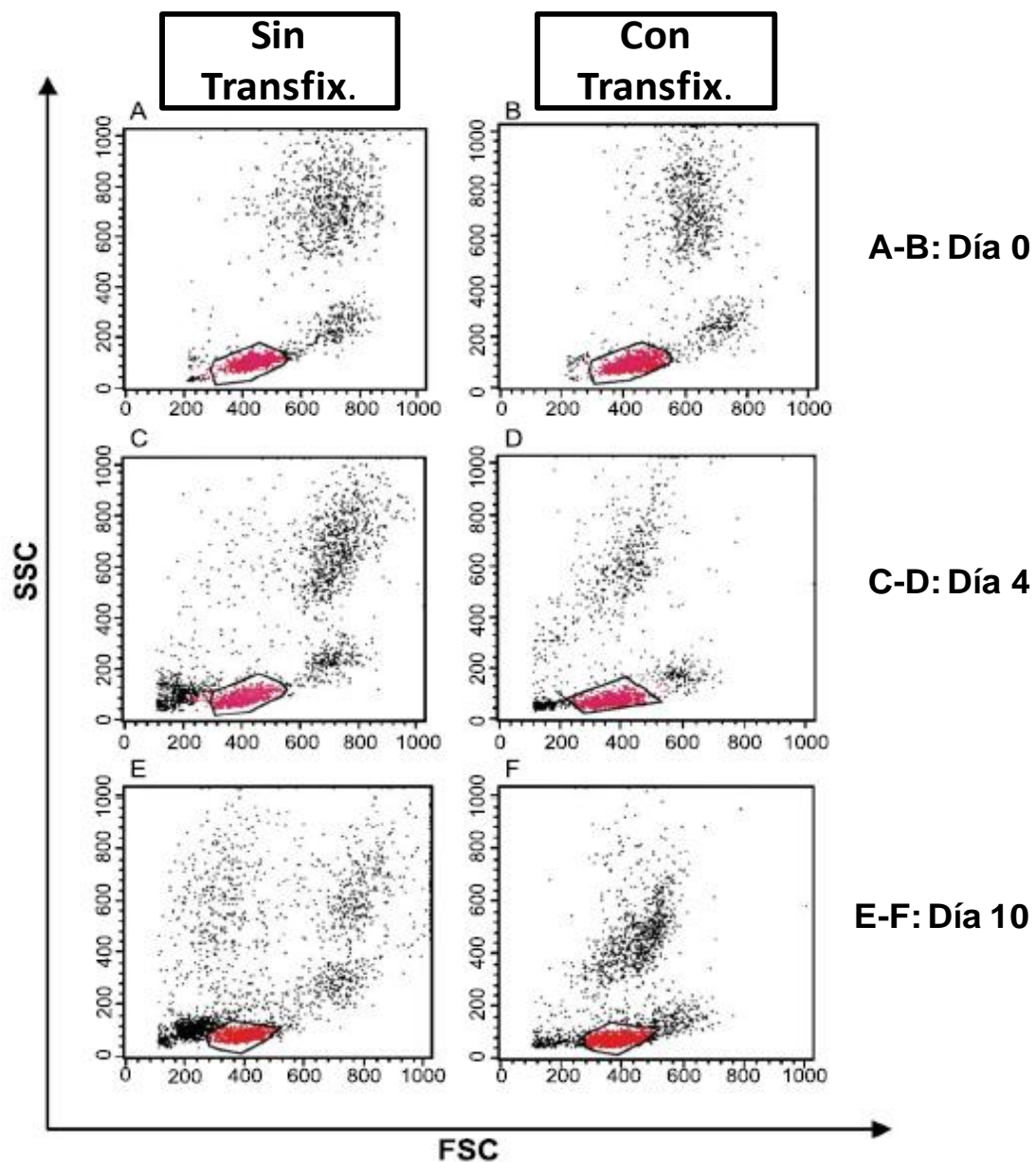


Figura 3. Gráficos representativos de Dot-Plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix incubadas a 4°C por 10 días. A partir de 4 días de almacenamiento a 4°C, las subpoblaciones de leucocitos no fijados y tratados con Transfix muestran patrones anormales de FSC y SSC (menor dispersión de la luz) (paneles C-F) siendo esta alteración mayor en las muestras sin Transfix. De forma particular la población de linfocitos es la que mejor se preserva al día 10 en comparación con neutrófilos y monocitos. Tomado y adaptado de Canonico B, et al. J Immunol Methods 2004.

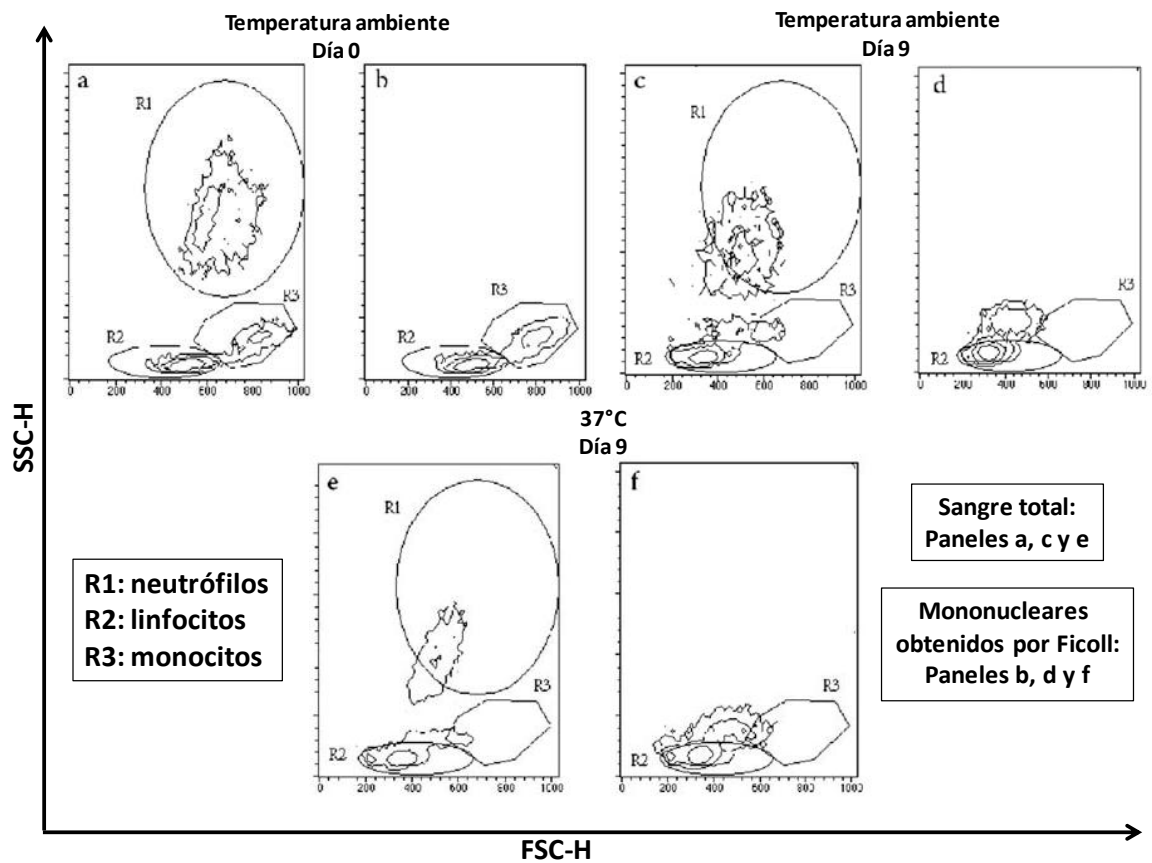


Figura 4. Gráficos representativos de Dot-Plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP total y células monocleares obtenidas mediante gradiente de Ficoll fijadas con Transfix e incubadas a temperatura ambiente y a 37°C hasta un periodo de 9 días. Después de 9 días de almacenamiento a temperatura ambiente en muestras de SP total y en monocleares, los linfocitos conservan los parámetros de FSC y SSC de forma similar al día 0. Sin embargo, en los neutrófilos y monocitos se evidencia una reducción significativa de FSC y SSC a temperatura ambiente y a 37°C. Tomado y adaptado de Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

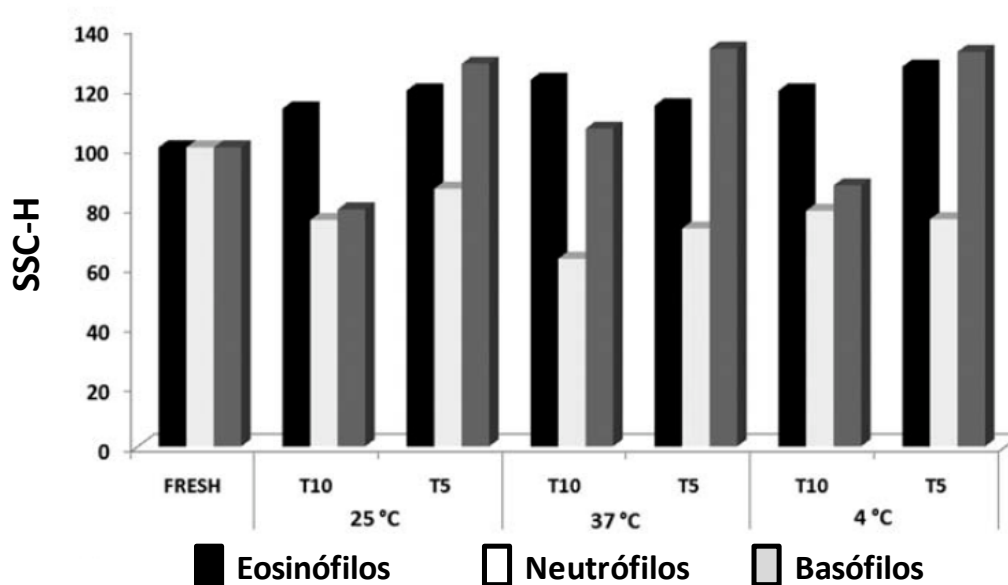


Figura 5. Evaluación de SSC en las subpoblaciones de granulocitos a diferentes temperaturas de incubación (4°C, 25°C y 37°C) en muestras de SP fijadas con Transfix (diluciones 1/10 y 1/5). A diferentes temperaturas de incubación (25°C, 37°C y 4°C) se observa un aumento gradual en el SSC de granulocitos eosinófilos y basófilos; por el contrario se evidencia una significativa reducción en el SSC de los neutrófilos cuando las muestras son diluidas a concentraciones 1/10 y 1/5 respectivamente. Tomado y adaptado de: Canonico B et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

3.4.1.1.3. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICOS

Estudios comparativos de la expresión de diferentes marcadores antigénicos entre muestras no tratadas con Transfix y muestras fijadas, describen que en las muestras no tratadas se observa una pérdida significativa de diferentes antígenos con el paso del tiempo, fenómeno que se correlaciona además con la presencia de células apoptóticas evaluadas con tinción con yoduro de propidio. En contraste con lo anteriormente descrito diversos estudios han demostrado que a 4°C de temperatura de incubación y después de 10 días de almacenamiento en las muestras fijadas con Transfix marcadores inmunofenotípicos como CD45 (Figuras 6A-C), CD3 y CD38 en la población de linfocitos se conserva. Así mismo en relación a la intensidad de fluorescencia (IF) para CD45 en la población de monocitos se encontró un ligero descenso del día 0 al día 4, el cual se mantuvo estable hasta el día 10 (Figuras 6D-F) (16), hallazgos similares en la expresión de

CD45 se encontraron en linfocitos y monocitos obtenidos a partir de SP mediante gradiente de densidad por Ficoll-Hypaque evaluando la expresión de esta molécula en estas poblaciones leucocitarias a diferentes concentraciones celulares (30.000, 60.000 y 120.000 células/ul) (19). Por el contrario, otros estudios muestran que los granulocitos son una población celular que presenta una reducción significativa en la IF de CD45 con respecto a muestras frescas en cerca del 20% de las células en el día 4 y del 30% al día 10 de incubación con Transfix (Figuras 6G-I), poniendo en evidencia que esta población celular es la más variable cuando se fija (16).

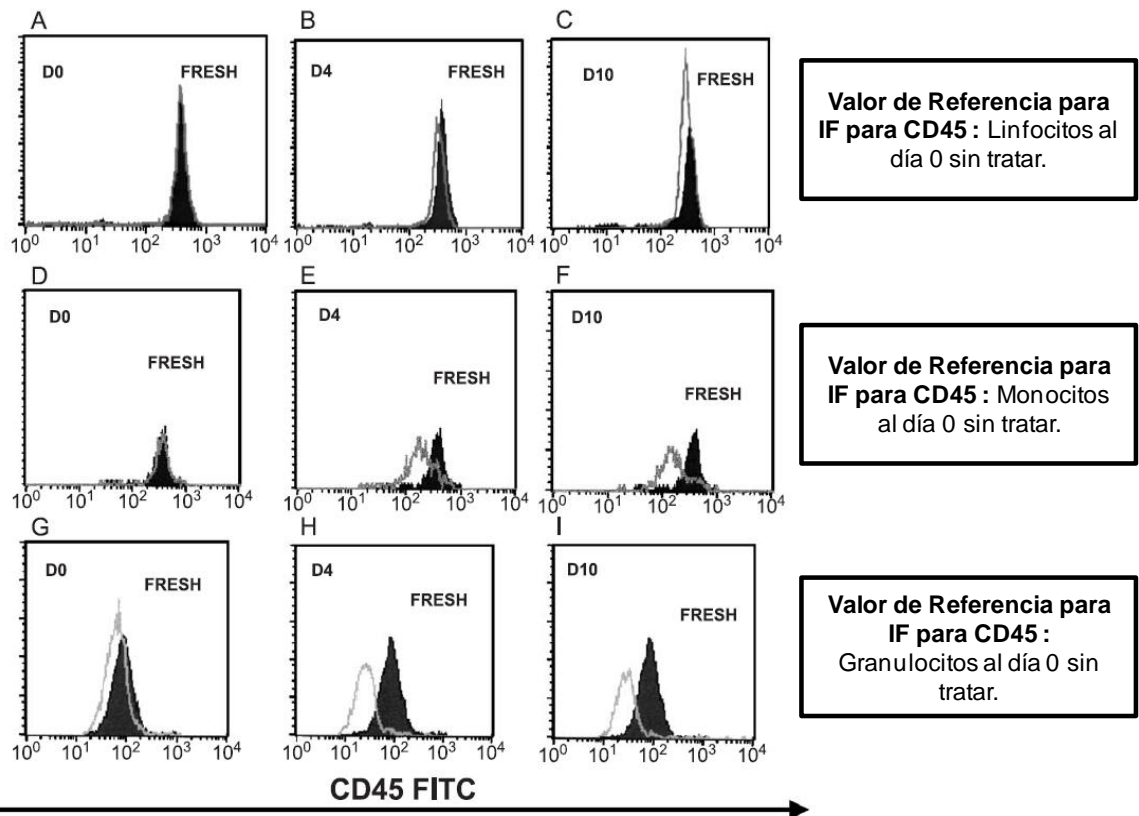


Figura 6. Evaluación de la intensidad de fluorescencia de la molécula CD45 en las diferentes subpoblaciones de leucocitos de SP no tratadas (histograma de color negro) y fijadas con Transfix a 4°C (histogramas de color gris) y almacenadas por 10 días. La intensidad de fluorescencia para CD45 disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los monocitos (desde el día 4 hasta el 10) y neutrófilos (desde el día 1) fijados con Transfix comparado con las muestras sin tratar. Por otra parte, en los linfocitos esta disminución es menor en estos períodos de tiempo evaluados. Tomado y adaptado de: Canonico B et al. J Immunol Methods 2004.

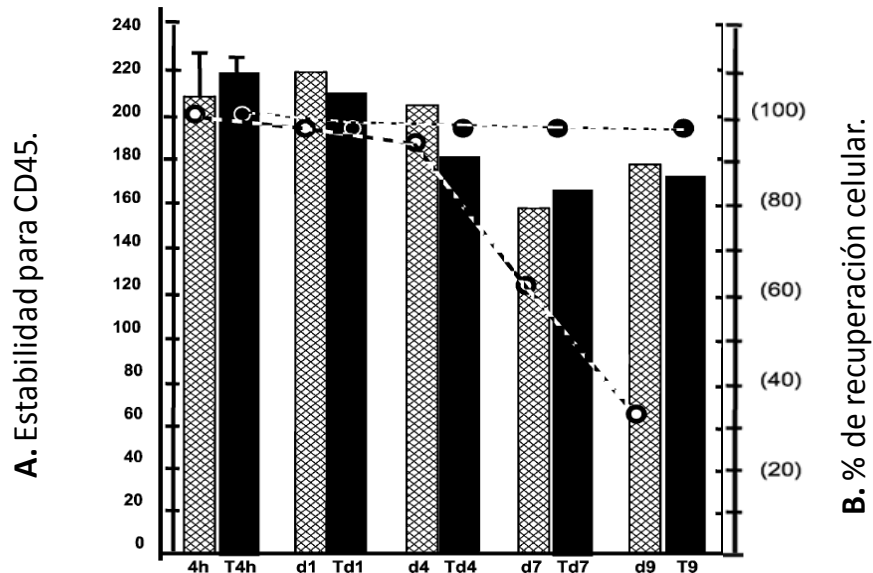
De la misma manera los resultados observados en muestras de SP y sangre de cordón umbilical con Transfix demuestran que a temperaturas de incubación como 25°C se conserva la estabilidad para CD45 en los linfocitos hasta 9 días de almacenamiento con una tasa de recuperación celular de casi del 100% (Figura 7) (20). Adicionalmente, a 25°C se observa estabilidad en la expresión de las moléculas CD3 y CD4 hasta 7 días de almacenamiento en linfocitos T (en muestras de sangre total y SP obtenida por separación mediante gradiente de densidad) (Figuras 8G-H) pero a 37°C la estabilidad de las mismas fue observada solo hasta después de 3 días de tratamiento con Transfix (Figuras 8E-F) (19). La evaluación de marcadores fenotípicos en poblaciones de granulocitos muestra que por ejemplo para la molécula CD123 en basófilos tras 14 días de fijación con Transfix a diferentes temperaturas de incubación (4°C, 25°C y 37°C), la IF se mantiene a 4°C y a temperatura ambiente (19). Otro parámetro evaluado por Canónico B et al 2010, fue el efecto de la dilución del Transfix (1/5 y 1/10) a diferentes temperaturas de incubación (4°C, 25°C y 37°C) en la expresión de CD45 en granulocitos y linfocitos, mostrando que la expresión de la molécula no se altera por efecto de la dilución (19).

3.4.1.1.4. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR EN LEUCOCITOS Y GLÓBULOS ROJOS

Varios trabajos han demostrado tanto en muestras no tratadas como fijadas con Transfix (sangre total y células mononucleares) un incremento en el porcentaje de células muertas y apoptóticas mediante tinción con los colorantes fluorescentes como yoduro de propidio (IP-FL3), 7 amino-actinomicina D (7-AAD) y anexina V (ANX) cuando estas muestras son almacenadas hasta 15 días a 4°C (Figura 9A-B) (19). Particularmente se ha observado que los granulocitos son la población leucocitaria más susceptible a la muerte celular con un incremento gradual en la captación de IP desde el día 0 hasta el día 10 de almacenamiento a 4°C, sin embargo la fijación con Transfix permite una mayor recuperación de estas células en comparación con las muestras no tratadas (Figuras 10A-F) (16). Una de las posibles explicaciones asociadas a este fenómeno de muerte, es que los granulocitos neutrófilos no expresan la proteína anti-apoptótica bcl-2 involucrada en retrasar la activación de la cascada de las caspasas 3, 7 y 9 en el proceso de apoptosis celular (21). Por otro lado las observaciones realizadas en la población de linfocitos confirman que son las células más resistentes a la muerte celular ya que después de 10 días no se observan diferencias significativas en el porcentaje de células IP+ en las muestras no tratadas y fijadas con Transfix (Figuras 10G-L) (16).

En los eritrocitos fijados con Transfix, después de la tinción con ANX (proteína con alta afinidad por el fosfolípido de membrana fosfatidilserina cuya positividad se asocia a apoptosis temprana) se observa un incremento en la emisión de fluorescencia de este colorante después de 2 días de almacenamiento a 4°C

confirmando que el Transfix induce efectos en la superficie de la membrana de esta población celular (Figura 11) (19).



Efecto del almacenamiento por 9 días a temperatura ambiente.

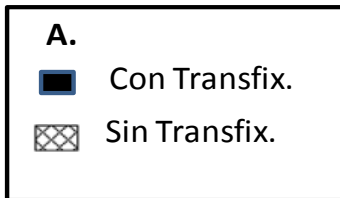


Figura 7. Estabilidad para la molécula CD45 y porcentaje de recuperación celular en la población de linfocitos en muestras de SP y sangre de cordón umbilical fijadas con Transfix a temperatura ambiente y monitorizadas por 9 días. A diferentes períodos de tiempo tanto en las muestras no tratadas como en las fijadas con Transfix (4 horas de almacenamiento: 4h, T4h; 1 día: d1, Td1; 7 días: d7, Td7 y 9 días: d9, Td9) se observa estabilidad en la expresión de CD45. Así mismo la tasa de recuperación celular en las muestras fijadas con Transfix es cerca del 100% para el día 9 (comparado con las muestras frescas a las 4h), mientras que para las muestras sin tratar el % de recuperación celular es inferior al 50% respecto a los resultados iniciales. Tomado y adaptado de: Bikoue A, et al. J Immunol Methods 2002.

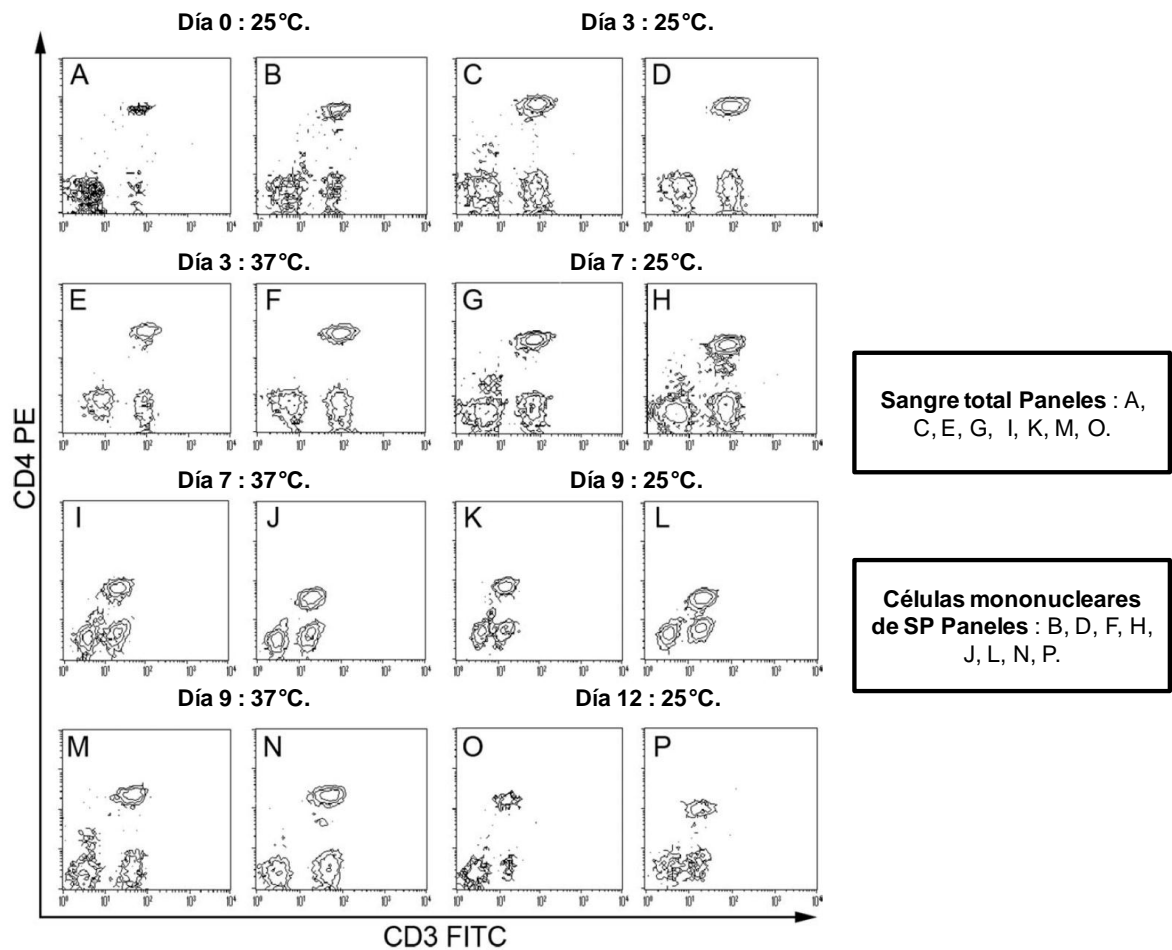


Figura 8. Dot plots bivariados de CD3-FITC vs CD4-PE en muestras de ST y células mononucleares de SP obtenidas por separación mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) tratadas con Transfix; incubadas a 25°C y a 37°C almacenadas hasta 12 días. En las muestras de ST y en las células mononucleares de SP tratadas con Transfix se observa que después de 7 días de almacenamiento a 25°C la IF para CD4 y CD3 se preserva, mientras que para 37°C la preservación de estas moléculas se observa solo hasta 3 días de almacenamiento Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

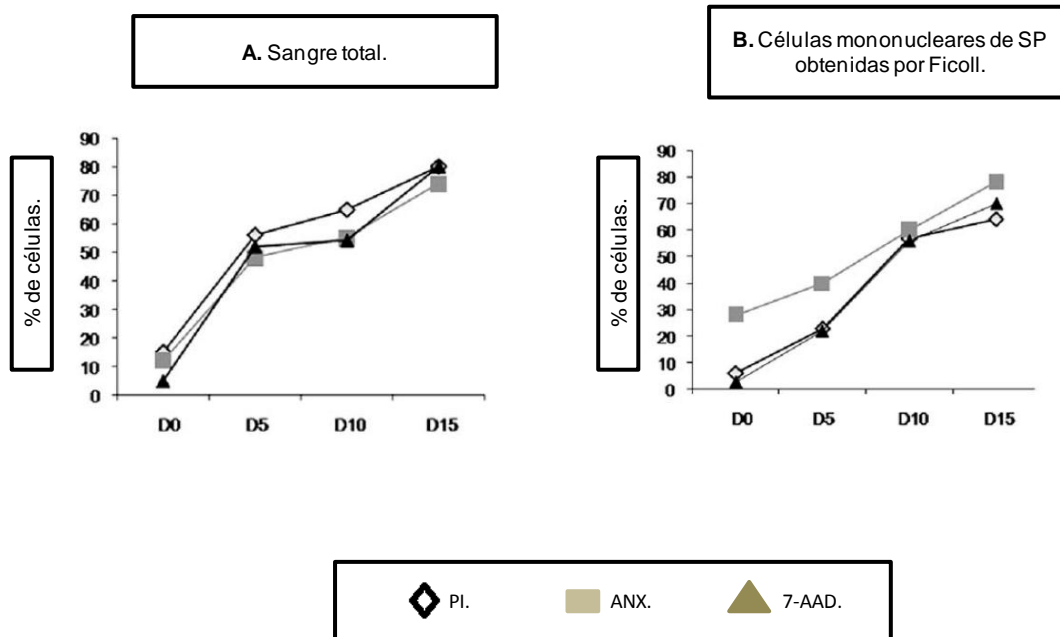


Figura 9. Evaluación del porcentaje de células muertas o apoptóticas mediante tinción con yoduro de propidio (PI- FL3), 7 amino-actinomicina D (7- AAD) y anexina V (ANX) en muestras de ST y células mononucleares de SP obtenidas mediante separación por gradiente de densidad (Ficoll Hypaque), almacenadas hasta 15 días a 4°C. Se observa un aumento significativo en la captación de PI y 7-AAD en las muestras de ST fijadas con Transfix desde el día 0 al día 15 en comparación con las células mononucleares; este resultado puede estar asociado a la alta frecuencia de células linaje granulocítico en esta muestra. En el caso de la detección de fosfatidilserina mediante tinción con ANX, aunque se observa aumento en la IF para esta molécula no se encontraron diferencias significativas en las muestras de ST respecto a las células mononucleares. Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010..

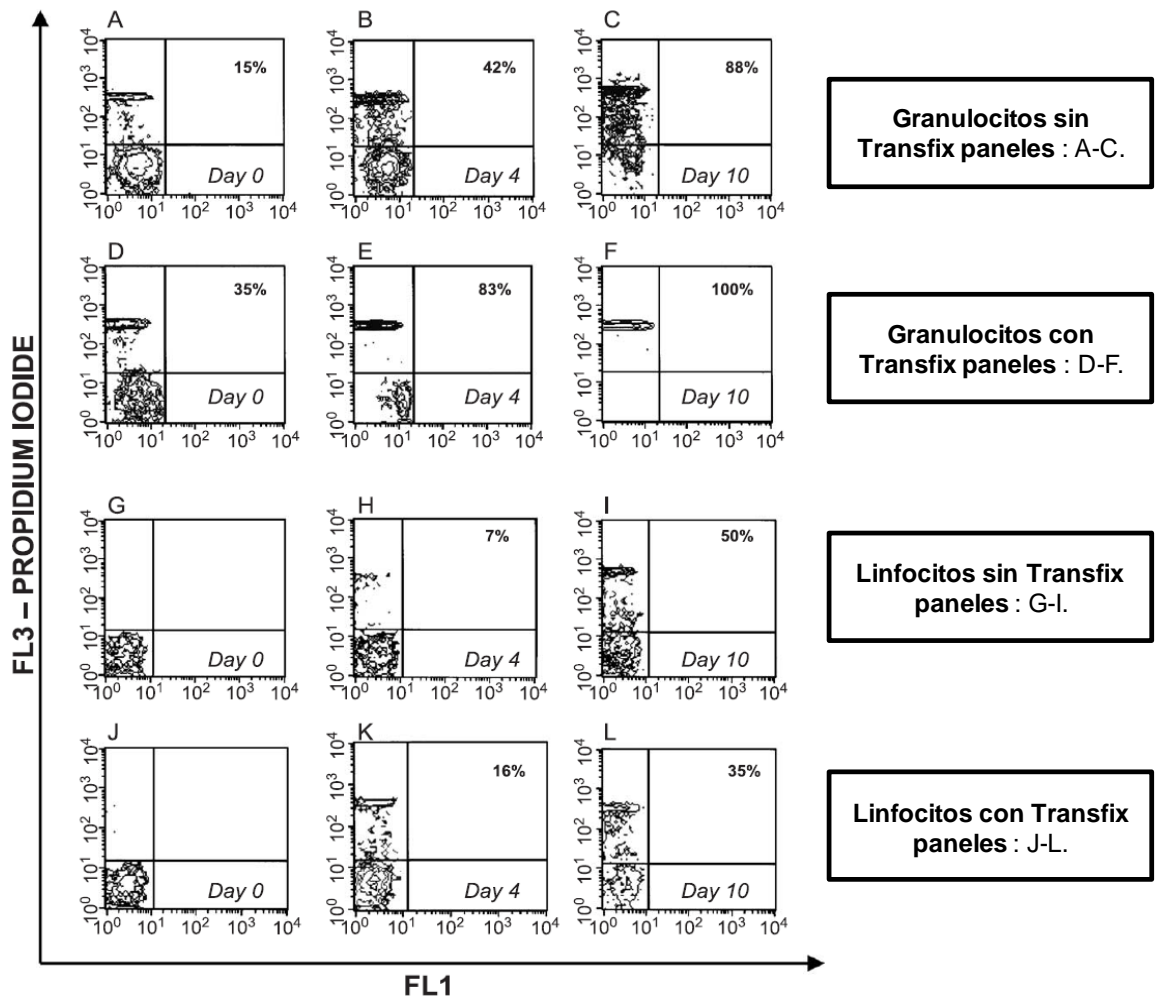


Figura 10. Dot plots bivariados de FL1 vs FL3 para la evaluación de la captación supravital de IP en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix a 4°C almacenadas por 10 días. La población de granulocitos es la más susceptible a la muerte celular ya que se observa incremento significativo en la IF para PI tanto en las muestras no tratadas ($p < 0,02$) como fijadas con Transfix ($p < 0,01$) en donde en estas últimas se evidencia una mayor proporción de células PI+ desde el día 1 (35%) hasta el día 10 (100%). Por otro lado el tratamiento con Transfix preserva mejor la población de linfocitos comparado con las muestras sin tratar después de 10 días de almacenamiento. Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. J Immunol Methods 2004.

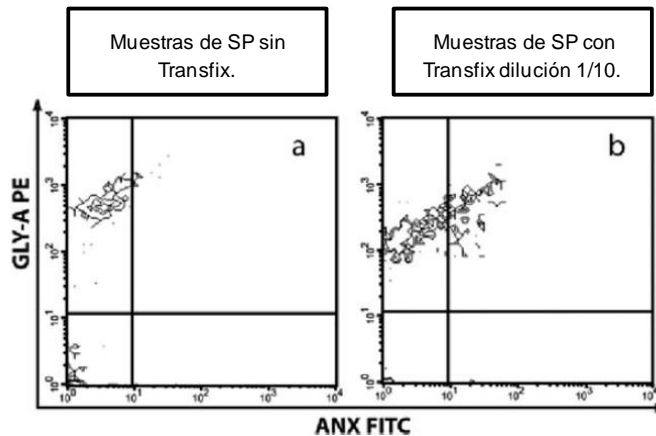


Figura 11. Dot plots bivariados de ANX-FITC vs GLY-A-PE para la detección de la captación supravital de anexina V (ANX) en la población de glóbulos rojos no tratados y tratados con Transfix después de 2 días de almacenamiento a 4°C. En la evaluación de la integridad de membrana y/o modificaciones en la permeabilidad celular en la población de eritrocitos se evidencia un aumento en el % de células ANX+ después de la exposición de los glóbulos rojos al Transfix. Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

3.4.1.1.5. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA CELULAR DE LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS

Estudios morfológicos mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) demuestran que tras 10 días de almacenamiento de muestras de SP fijadas con Transfix a diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 37°C), los linfocitos preservan estructuras como la membrana citoplasmática y celular (Figuras 12H y 13G, H y K, L) (19). Por el contrario la mayoría de granulocitos no fijados, morfológicamente tienen un patrón de apoptosis (Figuras 12E, G y 13E, I), mientras que en el caso de granulocitos tratados con Transfix se observan características similares a necrosis en el día 10 (Figuras 12F, H y 13G, K) (16). Del mismo modo en investigaciones recientes donde se evalúa el efecto del estabilizante Transfix en poblaciones de linfocitos y glóbulos rojos por microscopia electrónica de barrido (SEM) las características morfológicas de estas poblaciones celulares se conservan de forma similar a las del grupo control (muestras frescas día 0) (Figura 14H). Por el contrario, en las muestras no tratadas los eritrocitos muestran una morfología típica de equinocitos y en los linfocitos no se observan las

microvellosidades en la superficie celular cuando estas fueron analizadas tras 12 días de almacenamiento a 4°C (Figura 14G) (19).

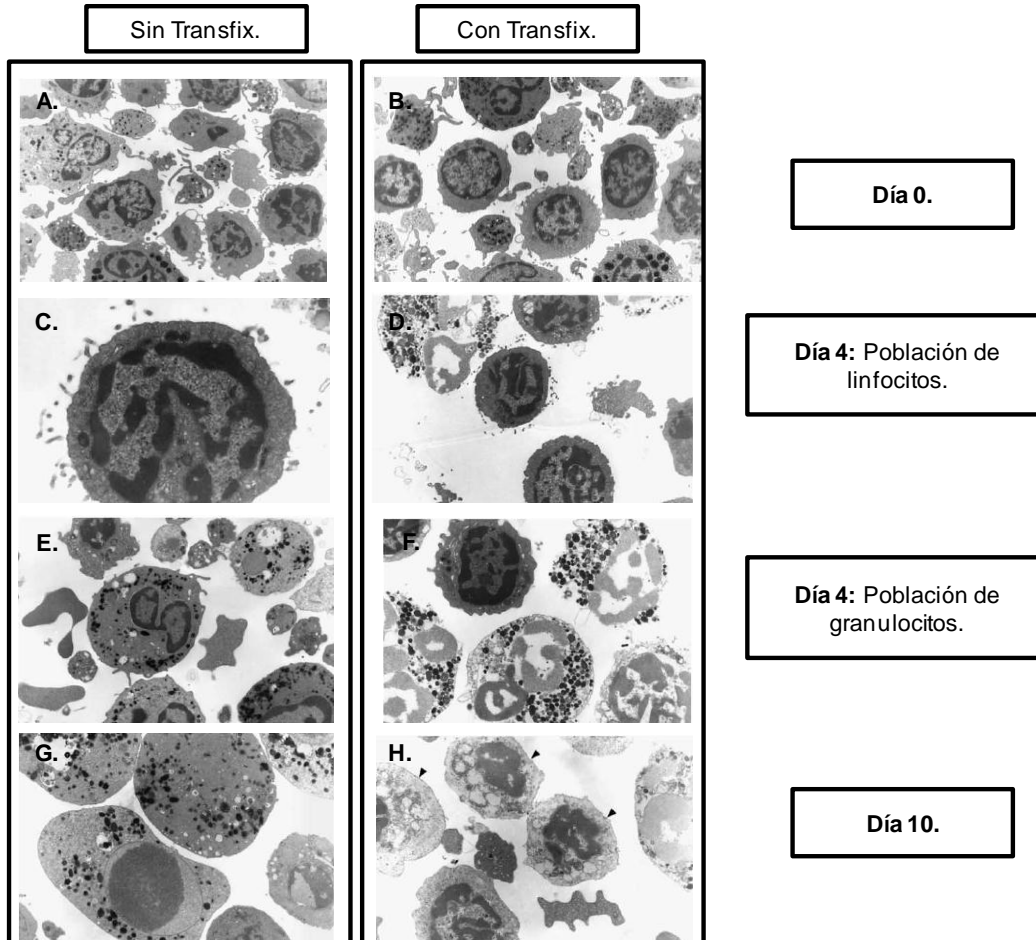


Figura 12. Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix a 4°C almacenadas por 10 días. Los análisis ultraestructurales muestran una buena conservación de la morfología celular en todas las poblaciones de leucocitos tanto en las muestras no tratadas como fijadas con Transfix en el día 0. La morfología de linfocitos no muestra cambios significativos en las muestras no tratadas y en las fijadas con Transfix. Por el contrario en granulocitos se observan características de células apoptóticas tempranas en las muestras no tratadas y patrones de necrosis celular en las muestras con Transfix después de 4 días de almacenamiento hasta el día 10 Tomado y adaptado de: Canonico B, Zamai L, et al. J Immunol Methods 2004.

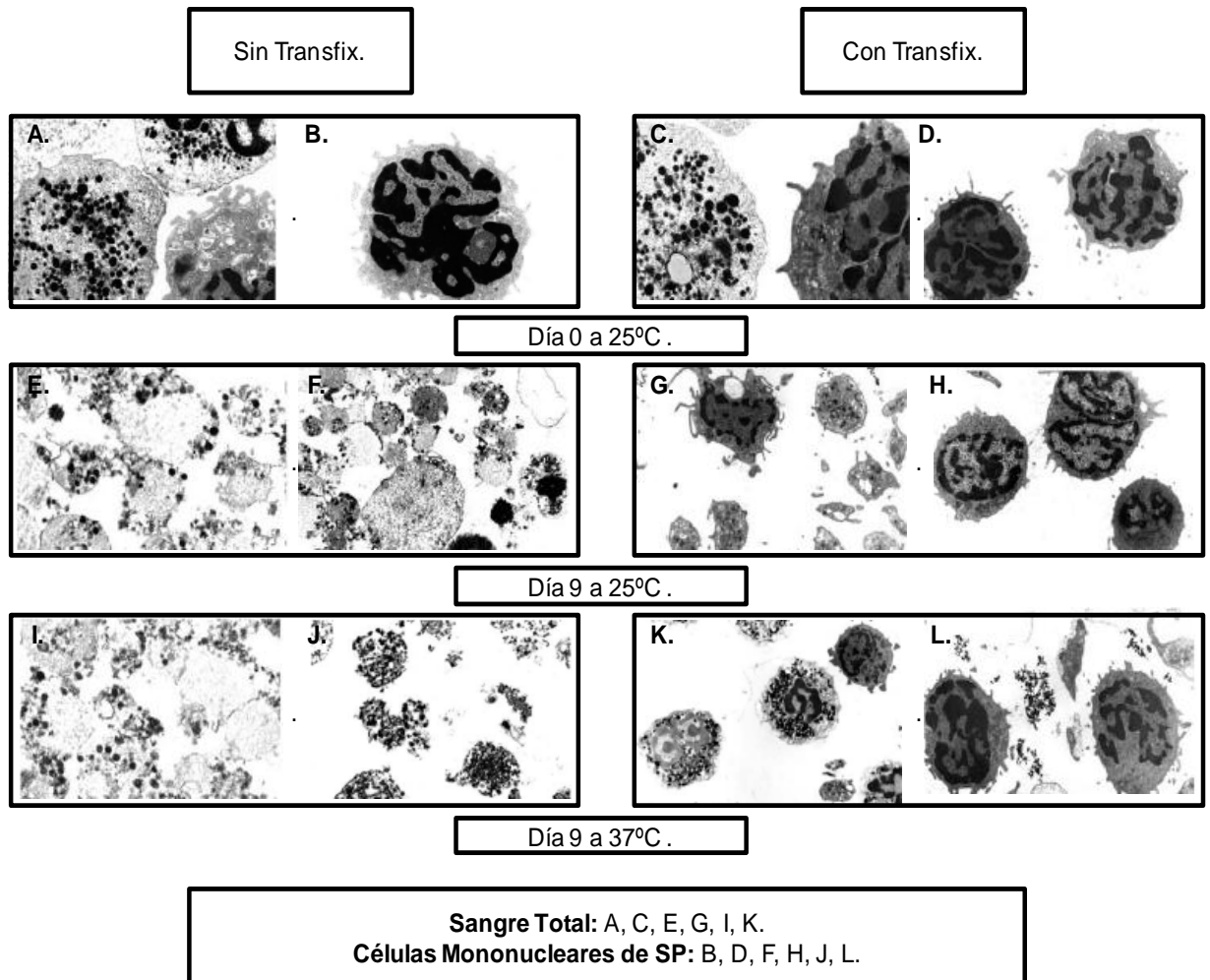


Figura 13. Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en muestras de ST y SP obtenidas por separación mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque) tratadas con Transfix; incubadas a 25°C y a 37°C por un período de 9 días. Después de 9 días de almacenamiento a 25°C y a 37°C en general se evidencia en las muestras no tratadas una alteración significativa en diferentes estructuras celulares principalmente en la población de granulocitos y en menor grado en los linfocitos. Por el contrario en las muestras fijadas con Transfix diferentes estructuras celulares como la membrana celular y componentes citoplasmáticos se preservan a temperaturas de 25°C y 37°C en la población de linfocitos mientras que en la población de granulocitos se observan células con patrón necrótico. Así mismo en los análisis del día 0 tanto en las muestras tratadas y no tratadas con Transfix se observan similares aspectos morfológicos. Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

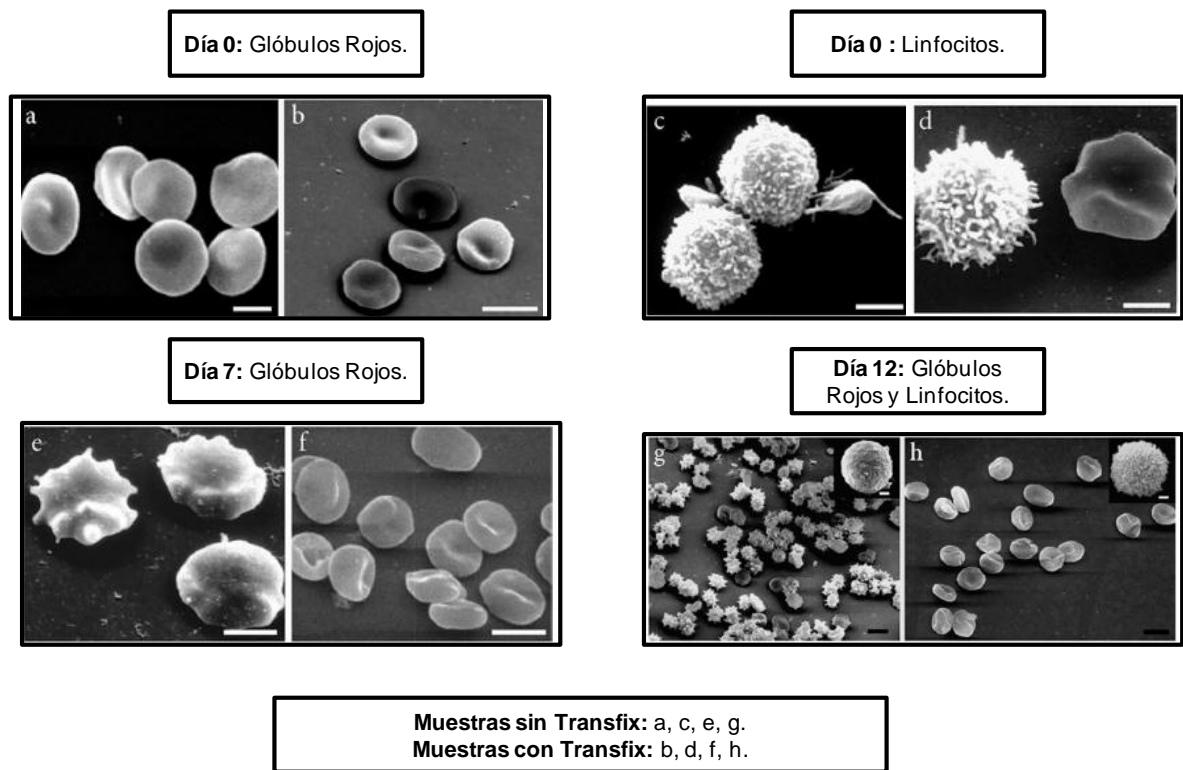


Figura 14. Análisis por microscopía electrónica barrido (SEM) en poblaciones de eritrocitos y linfocitos en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix incubadas a 4°C y almacenadas por 12 días. Después de 7 días de almacenamiento en las muestras sin tratar se observan ligeras alteraciones en la morfología de los GR (con rasgos iniciales de células tipo equinocito) que son más evidentes después de 12 días de almacenamiento. En el caso de los linfocitos en este mismo período de tiempo las microvellosidades en la superficie de la membrana celular no son identificadas con claridad. Por otro lado en el caso de las muestras fijadas con Transfix después de 12 días se evidencia una preservación de las estructuras celulares (membrana celular y microvellosidades) comparado con el grupo control del día 0. Tomado y adaptado de: Canonico B, Betti, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

3.4.1.1.6. OTROS TRABAJOS DE APLICACIÓN

Varias investigaciones centradas en la evaluación del contenido de DNA por CMF revelan la ausencia de cualquier patrón de apoptosis en las muestras de leucocitos fijadas con Transfix después de 12 días de almacenamiento. Por el contrario los eventos apoptóticos aparecen más rápidamente (7 días de almacenamiento) y son más significativos en la población de granulocitos no tratados (Figura 15E-F). Agregando a lo anterior varios trabajos en donde evalúan

por el método del TÚNEL el efecto del Transfix sobre diferentes subpoblaciones celulares revelan que las características morfológicas mejor preservadas están en la población de linfocitos (regularmente esféricos) (Figura 16E) pero que en la población de granulocitos (con formas irregulares) no se observa este efecto después de 14 días de almacenamiento (Figura 16I) (19).

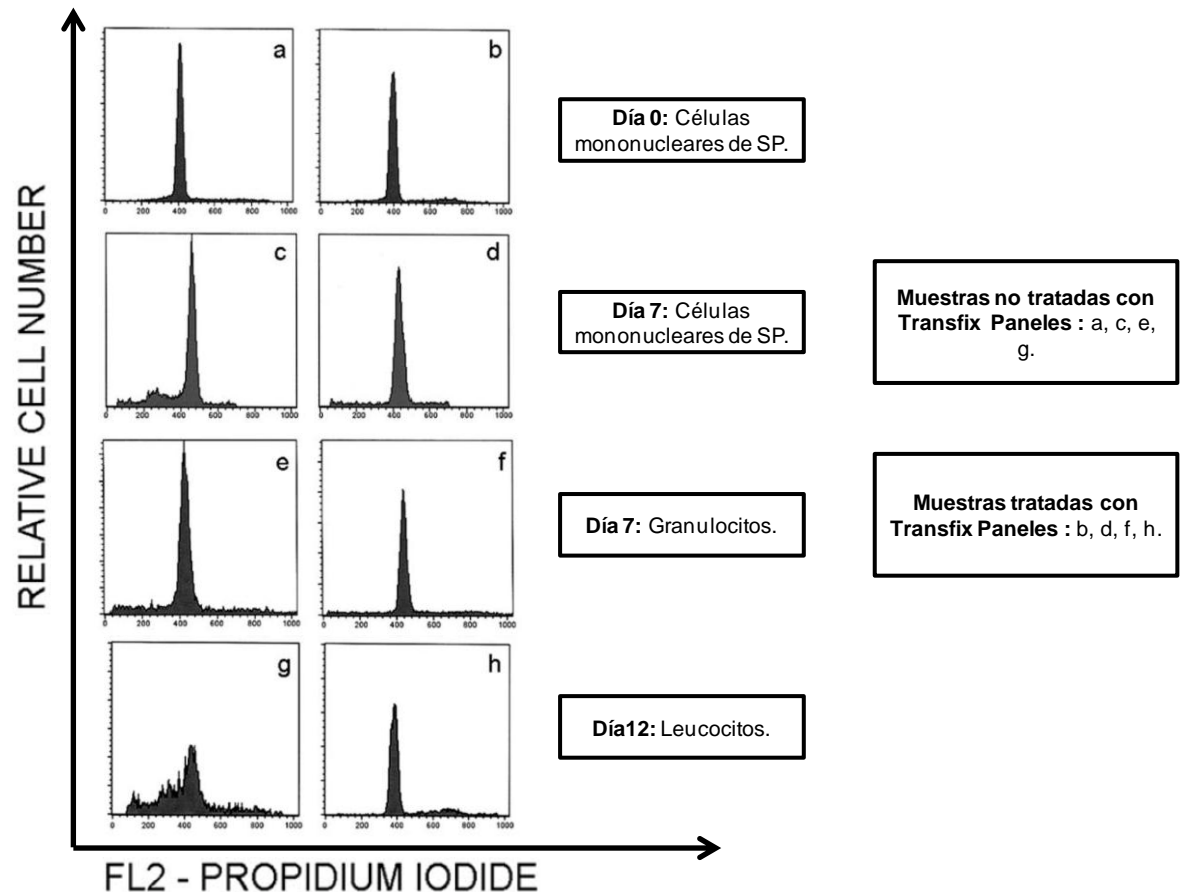


Figura 15. Evaluación del contenido de DNA por CMF en muestras de SP (obtenidas por separación mediante gradiente de densidad Ficoll Hypaque). En las muestras no tratadas con Transfix en el día 7 y 12 se destaca la mayor presencia células hipodiploides y de restos celulares. Particularmente los eventos apoptóticos aparecen más rápidamente y son significativos en la población de granulocitos en las muestras sin tratar a los 7 días. En general para los diferentes períodos de tiempo analizados la evaluación del contenido de DNA mostró la ausencia de patrones de apoptosis en las muestras con Transfix. Tomado y adaptado de: Canonico B. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

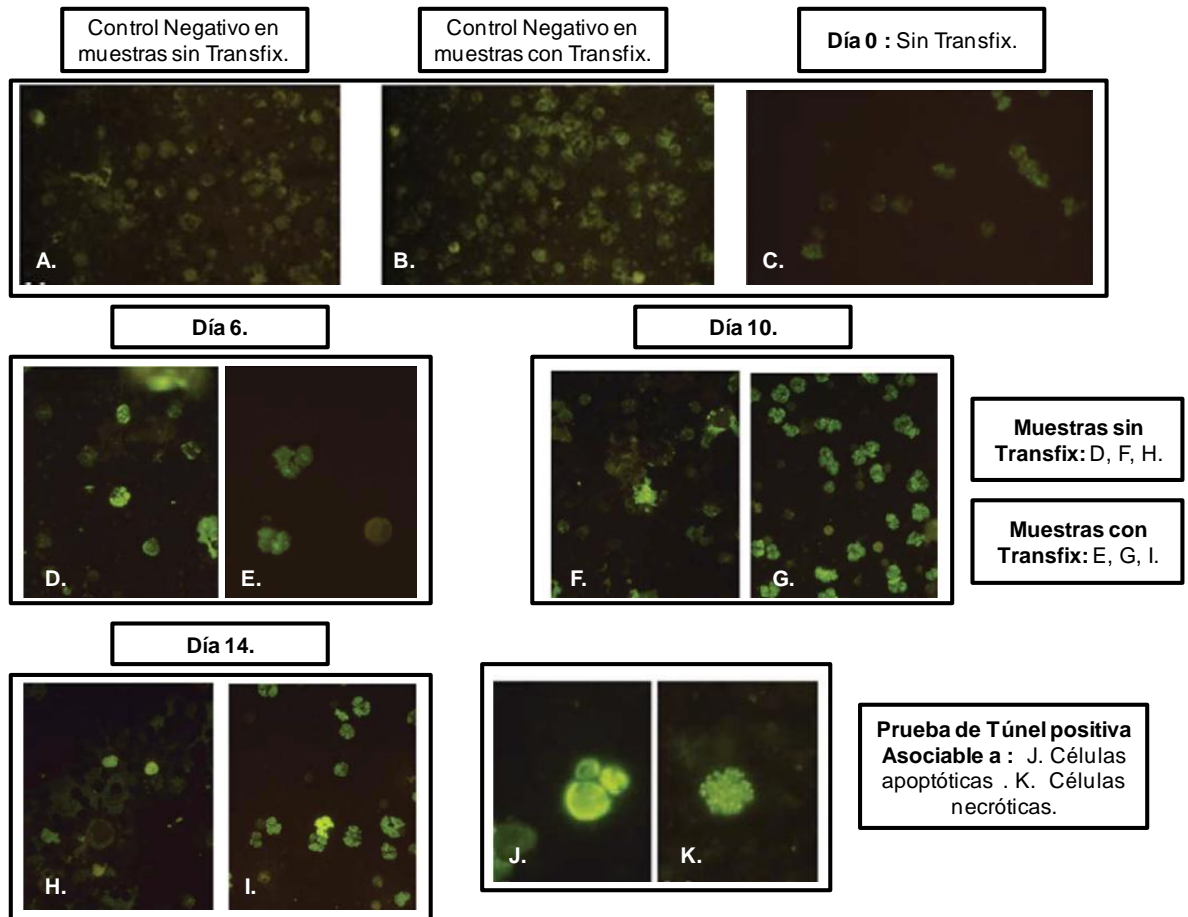


Figura 16. Evaluación de la fragmentación del DNA por el método del TÚNEL en muestras de SP no tratadas y fijadas con Transfix. Para el día 0 las poblaciones celulares analizadas están en óptimas condiciones pero progresivamente con el paso de los días en las muestras sin tratar aumentan la cantidad de células en apoptosis. Las muestras tratadas con Transfix son las que preservan mejor la viabilidad. En las muestras sin tratar después de 14 días de almacenamiento la muerte celular incrementa de forma significativa. Tomado y adaptado de: Canonico B, et al. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 2010.

Algunos grupos de investigación han realizado trabajos en el análisis para la enumeración de células progenitoras endoteliales (CPE) y células T angiogénicas, encontrando que después de 7 días de almacenamiento los recuentos celulares para las células T angiogénicas fueron virtualmente idénticos a los de las muestras frescas (con un valor de $r=0.887$ por determinación del coeficiente de correlación de Pearson) Sin embargo para las CPE los recuentos celulares fueron notablemente mejores a los 3 días($r=0.638$) que a los 7 días (con un valor de $r=0.454$) de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C a una dilución de 1/5) (22).

3.4.1.1.7. EFECTO DEL ESTABILIZANTE TRANSFIX EN MUESTRAS DE LCR

Previos reportes revelan que las muestras de LCR con frecuencia se caracterizan por tener recuentos celulares bajos que decaen rápidamente con el tiempo. De modo que la estabilización de las muestras cuando estas no son procesadas dentro de los primeros 30 minutos tras su recolección conserva los recuentos celulares en muestras de LCR no infiltradas en cantidades similares a las muestras frescas durante horas hasta varios días (48 a 72 horas a 4°C a una dilución 1/5); confirmando que este reactivo evita el deterioro de las células debido a los rápidos efectos citotóxicos observados en los leucocitos in vitro (9, 10).

Diversos autores concluyen que el diagnóstico de las leucemias en LCR es dependiente de la estabilidad de las células y que cerca del 30% de los diagnósticos positivos no son reportados en las muestras no estabilizadas. Es por esto que en las muestras de LCR, en donde los hallazgos por citología convencional (CC) pueden ser difíciles de detectar debido al bajo contenido celular de las muestras y a las similitudes entre las células benignas y malignas, los análisis por CMF de las muestras estabilizadas con Transfix aumentan de forma significativa la sensibilidad y especificidad para la detección de poblaciones celulares neoplásicas en este tipo de muestras de origen biológico (9, 10).

3.4.2. DEFINICIÓN Y RECOMENDACIONES DE USO TÉCNICO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT.

Cyto-Chex BCT (Streck, Omaha, NE, USA) es un reactivo preservante indicado para la toma y almacenamiento de muestras de SP, sangre de cordón umbilical y MO para la determinación de recuentos celulares e inmunofenotipos de las diferentes subpoblaciones de leucocitos analizadas por CMF; minimizando los efectos adversos del tiempo y facilitando el transporte de las muestras desde el sitio local de su recolección hasta el centro de análisis por un período de 7 días (para la evaluación de diferentes CDs como CD2, CD5, CD7, etc.), hasta 14 días post-recolección (panel HIV) a una temperatura de incubación de $18-22^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente este estabilizante ofrece la posibilidad de conservar la integridad de las muestras a diferentes temperaturas desde 2°C a 10°C , 30°C y 37°C a diferentes tiempos de almacenamiento, facilitando el empleo del reactivo en

diferentes lugares del mundo. En la tabla 5 se detalla las indicaciones técnicas de empleo.

Tabla 5. Indicaciones técnicas de empleo del reactivo Cyto-Chex BCT.

Variable	Indicaciones técnicas de empleo
Presentación del reactivo	Tubos de 5ml que contiene anticoagulante K3EDTA y un conservante en medio líquido
Aspecto físico del reactivo	Líquido transparente
Condiciones de almacenamiento del reactivo antes de su utilización	La estabilidad del reactivo sin usar se mantendrá hasta la fecha de caducidad si se almacena a temperatura ambiente (18- 30 °C). Se recomienda no exponer el reactivo a temperaturas menores de 0°C o mayores de 50°C antes de su uso
Indicios de deterioro del reactivo	Fecha de caducidad indicada en el reactivo este fuera de tiempo Turbidez o precipitado visible del reactivo del tubo antes de ser utilizado
Tipo de muestra	Se puede utilizar en la toma de muestras de SP, sangre de cordón umbilical, y MO*
Tipo de anticoagulante empleado	El reactivo Cyto-Chex BCT se debe emplear con el anticoagulante K3EDTA ya que las muestras recolectadas en otros anticoagulantes podrían ocasionar coagulación de la muestra
Dilución recomendada de empleo	El preservante contenido en los tubos con K3EDTA está disponible para su uso con las muestras sin necesidad de algún tipo de dilución** En el caso de alícuotas tomadas de los tubos originales solo con K3EDTA y muestras de MO se recomienda emplear un volumen igual al de la muestra*
Condiciones de almacenamiento (reactivo y muestra)	<ul style="list-style-type: none"> • 2°C-10°C: La muestra es viable hasta por 14 días post-recolección (panel HIV) • 18-22°C: Preservación hasta 14 días (panel HIV)*** y 7 días de diferentes CDs (CD10, CD20, etc.) después de su recolección • 30°C: Estabilidad hasta 7 días (panel HIV) • 37°C: Para moléculas como CD8, CD3 y CD4 se describe que la estabilidad de las muestras son de 48 horas y 72 horas post-recolección (CD8 y CD3, CD4 respectivamente)
Tipo de análisis que se pueden realizar	Determinación de inmunofenotipo en pacientes normales, HIV/SIDA y con sospecha de alguna neoplasia hematológica (en donde se evalúan diferentes CDs****) por CMF Recuentos celulares absolutos (pacientes HIV y sanos) Evaluación de características como dispersión de la luz (por FSC y SSC)
Otros	Debido a que el reactivo viene listo para su uso se debe llenar el tubo completamente según las indicaciones del fabricante, ya que un llenado excesivo del tubo recolector generaría resultados analíticos incorrectos o un rendimiento deficiente del producto No se debe congelar las muestras recolectadas con el reactivo ya que podría quebrarse (temperaturas menores a 2°C)

* Trabajos en MO en la literatura hasta el momento no han sido publicados, pero el laboratorio fabricante y distribuidor del reactivo Cyto-Chex BCT (Streck, Omaha, NE, USA) junto con su grupo de investigadores (Warrino D et al) han realizado trabajos de aplicación que se encuentran disponibles en la página web.

** El reactivo Cyto-Chex BCT no diluye las muestras por tal motivo, no se requiere hacer una corrección de factor de dilución a fin de obtener valores para la determinación de los recuentos celulares absolutos.

***. El panel HIV que se describe consiste en la determinación de moléculas CD como CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19, CD45.

**** CD: Clúster de diferenciación.

3.4.2.1. TRABAJOS DE APLICACIÓN EN CMF CON EL EMPLEO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT

3.4.2.1.1. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECuentOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS

Warrino D et al, en los últimos años han realizado múltiples trabajos para evaluar el efecto de las diversas temperaturas de almacenamiento (2-10°C, 18-22°C, 30°C y 37°C) a diferentes tiempos de incubación (desde 2 hasta 14 días) sobre los recuentos celulares de diversas subpoblaciones de leucocitos. Estas observaciones indican que las muestras de SP de donantes sanos pueden ser incubadas a temperaturas de refrigeración (2-10°C) para la determinación de recuentos celulares del panel HIV (CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19, CD45) demostrando que el tiempo de estabilidad de las muestras puede llegar a ser hasta 14 días post-recolección ya que los recuentos celulares son similares a los de las muestras frescas sin tratar (Tabla 6) (23). Así mismo estudios realizados a temperaturas de 18-22°C muestran que los recuentos celulares absolutos de LT CD3+, CD4+ y CD8+ realizados en muestras de SP (de donantes sanos y pacientes HIV+) recolectadas en tubos con K3EDTA (analizados 6 horas post-recolección) comparados con los resultados obtenidos en muestras con Cyto-Chex BCT se correlacionan (con valores de R₂ cercanos a 1) permitiendo detectar con gran exactitud los recuentos celulares por períodos superiores a 7 días post-recolección de la muestras. Por otra parte se ha detectado que en donantes sanos los recuentos celulares de linfocitos CD19+, CD16/56+ y CD45+ en muestras tratadas con Cyto-Chex BCT (evaluadas a las 6 horas y 7 días) pueden ser comparables con las muestras frescas con K3EDTA (donde los valores de R₂ son mayores a 0,96) sin que se observe alguna diferencia significativa (< al 10%) en los resultados obtenidos (3).

De forma particular los análisis realizados a elevadas temperaturas de incubación (30°C), para recuentos celulares de LT CD3+, LT CD4+ y LT CD8+ en muestras preservadas con Cyto-Chex BCT (evaluadas a los 7 días) son consistentes con los datos obtenidos con las muestras frescas recolectadas con K3EDTA (analizadas 6 horas post-recolección). Además estas mismas observaciones se identificaron en las muestras incubadas a 37°C después de 72 horas de almacenamiento con Cyto-Chex BCT.

Tabla 6. Comparación de recuentos absolutos celulares en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT después de 14 días de almacenamiento a temperatura de incubación de 2°C a 10°C.

Absolute Count Summary			
CD Marker	Cyto-Chex BCT (6° C for 14 days)	EDTA (6 hours)	Percent Difference (%)
CD3	1684	1769	-4.8
CD4	1172	1223	-4.2
CD8	448	483	-7.3
CD45	2279	2385	-4.4
CD19	306	319	-4.2
CD16+CD56	261	276	-5.1

NOTA: Para realizar el cálculo del porcentaje de diferencia entre las muestras comparadas se debe aplicar la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\text{Rto absoluto muestras con Cyto-Chex BCT (14 días)} - \text{Rto absoluto muestras con K3EDTA}}{\text{Rto absoluto muestras con K3EDTA}} \times 100\%$$

Resultado relevante: Las comparaciones de los resultados obtenidos en las muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT demuestran que el porcentaje de diferencia es menor del 10% demostrando que el reactivo preservante conserva las muestras después de 14 días post-recolección a temperatura de refrigeración.

3.4.2.1.2. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE RECuentOS CELULARES RELATIVOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS

Recientes investigaciones determinaron que los recuentos relativos para diferentes subpoblaciones de linfocitos (CD3+, CD4+, CD8+, CD3/CD45RA+, CD3/CD45RO+, CD19+ y CD16/CD56+) a temperatura ambiente y a 4°C (para el caso de LT CD3, LT CD4 y LT CD8) en muestras tratadas con Cyto-Chex BCT analizadas por 7 días se mantuvieron estables (Figura 17A-F y 18A), mientras que en el caso de las muestras sin tratar se preservaron por 72 horas de 18°C a 22°C (24,25).

En contraste con lo anteriormente descrito, a temperatura ambiente en el caso de la evaluación del porcentaje de LT CD3/CD25+ y LT CD3/HLA-DR+ fueron estables por 72 y 48 horas respectivamente en muestras con K3EDTA pero mostraron gran variabilidad después de 24 horas cuando las muestras fueron tratadas con Cyto-Chex BCT por lo que en este tipo de análisis (marcadores asociados a activación celular) se sugiere que se realice el mismo día de recolección de la muestras tanto con anticoagulante como con el reactivo preservante (Figura 18B-C). Así mismo se observa que para los recuentos relativos de LT CD3/CCR5+ y LT CD3/CXCR3+ (receptores para quimioquinas) se extendió la estabilidad de los marcadores hasta 7 días (Figura 18D-E) ya que en el caso de las muestras con K3EDTA se evidenció una estabilidad de 24 horas en estas moléculas. De la misma forma en los LT CD3/CLA+ (antígeno linfocitario cutáneo) se evidenciaron los mismos resultados en las muestras tratadas; sin embargo el porcentaje de células positivas fue de la mitad con respecto a las muestras con K3EDTA que mostraron una estabilidad después de 2 días post-recolección (Figura 18F) (24).

Resultados de previos estudios demuestran que los recuentos celulares relativos para las subpoblaciones de leucocitos (neutrófilos, monocitos y LT CD3+) en el análisis de la PSGL-1 (CD162) muestran un ligero descenso en los recuentos celulares en los granulocitos neutrófilos y monocitos a temperaturas de refrigeración y ambiente; pero que para el caso de los LT CD3+ la proporción de células disminuye drásticamente con el tiempo en 50% a 60 % a temperatura de 18°C a 22°C. De esta manera la pérdida de células positivas fue específica para el caso de la PSGL-1 en LTCD3+ ya que no se presentó alguna pérdida significativa en la proporción de las otras poblaciones celulares evaluadas (LT CD3/CD4+, LT CD4+ y LT CD8+) (Figura 19A-C) (25).

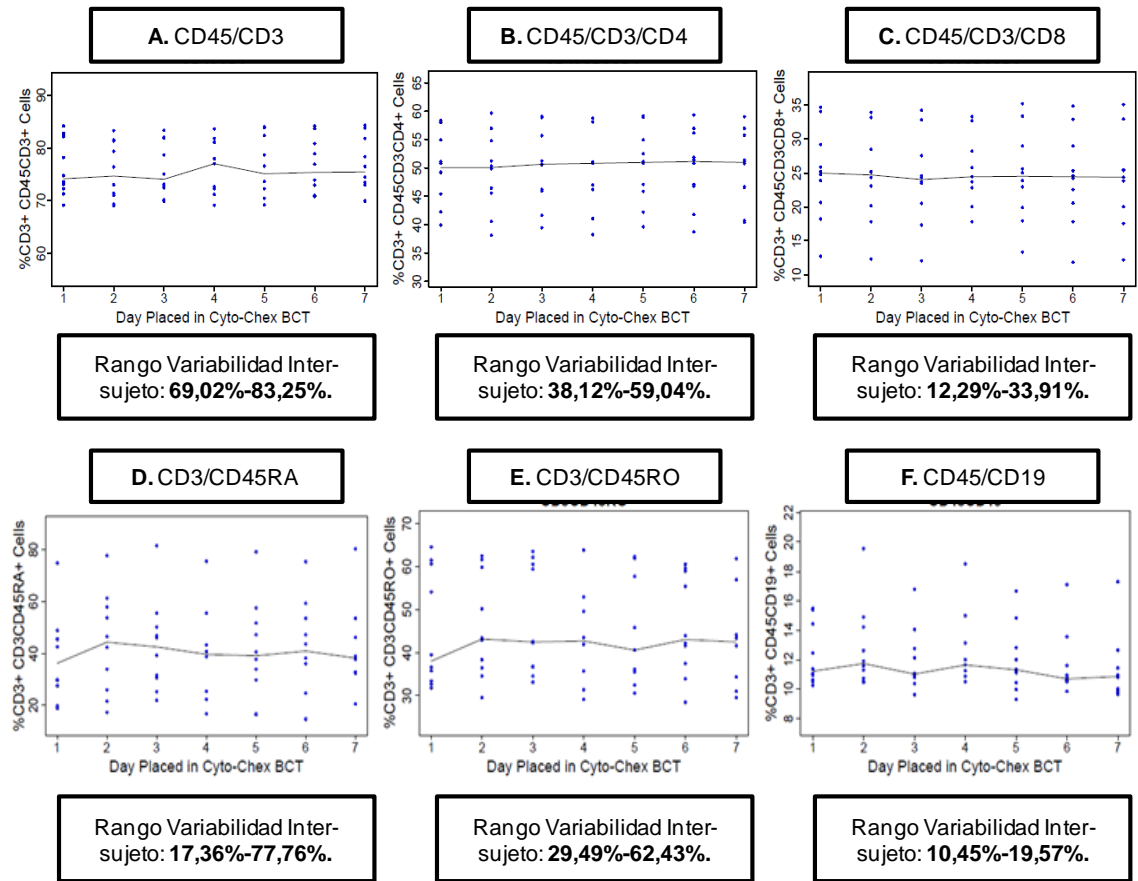


Figura 17. Evaluación de los recuentos relativos en subpoblaciones de linfocitos en muestras de SP estabilizadas con Cyto-Chex BCT monitorizadas por 7 días a temperatura ambiente. Los marcadores fenotípicos en linfocitos son estables después de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente ya que los recuentos relativos de cada uno de los pacientes evaluados (representados por los puntos en las gráficas) se encuentran dentro de los rangos de variabilidad inter-sujeto y estos pueden ser comparados con las muestras con K3EDTA (a la 48 horas) sin que se observe una diferencia significativa ($p > 0,05$). Tomado y adaptado de: Davis C, et al. J Immunol Methods 2011.

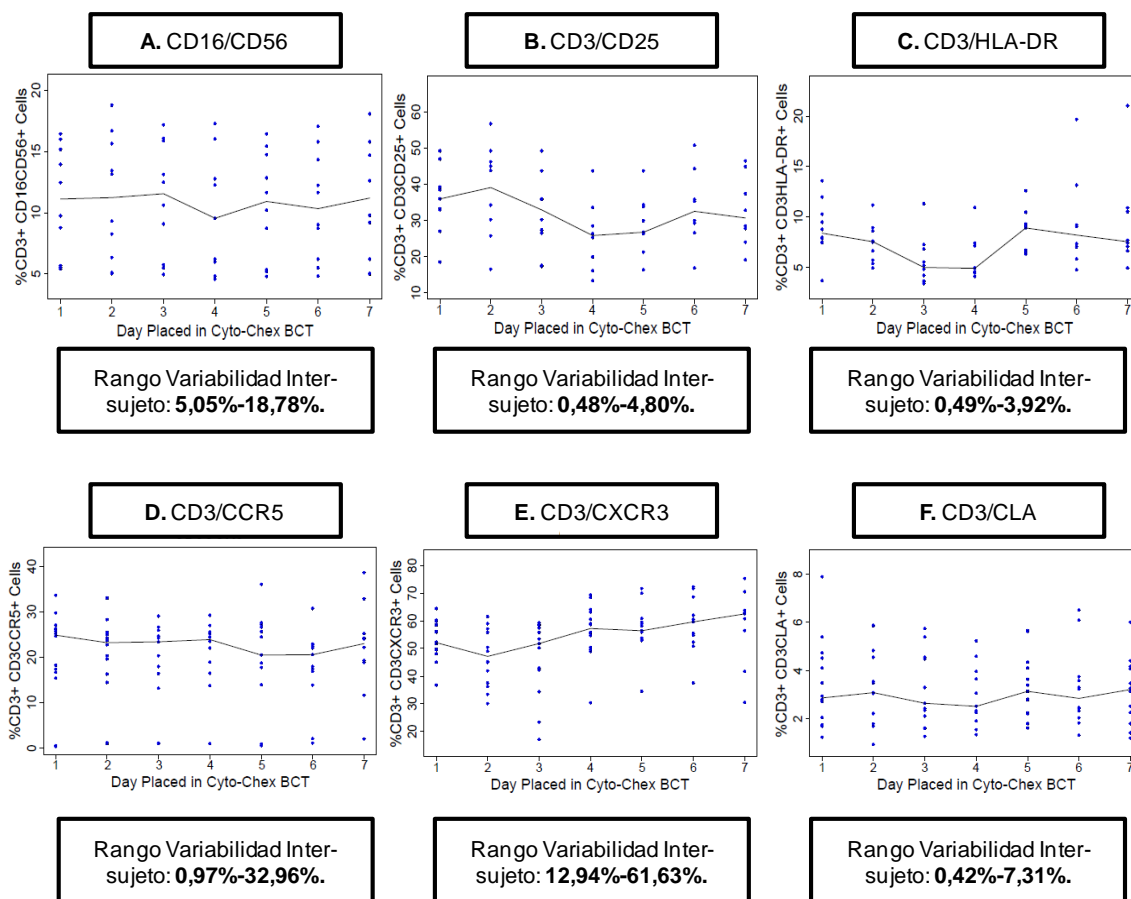


Figura 18. Evaluación de los recuentos celulares relativos para diferentes CDs en las poblaciones de linfocitos en muestras de SP estabilizadas con Cyto-Chex BCT monitorizadas por 7 días a temperatura ambiente. En el análisis de los receptores para quimioquinas (CCR5, CXCR3) y la molécula CLA (antígeno linfocitario cutáneo) muestra una conservación de estas moléculas a los 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente ya que los recuentos relativos de cada uno de los pacientes evaluados (representados por los puntos en las gráficas) están dentro de los rangos de variabilidad inter-sujeto y estos pueden ser comparados con las muestras con K3EDTA (a la 48 horas) sin alguna diferencia significativa en los resultados. Por otro lado en el análisis del porcentaje de células positivas en el caso de los marcadores de activación (CD25 y HLA-DR) es mayor con respecto a los rangos de variabilidad inter-sujeto desde el primer día de la estabilización. Además si estos resultados son comparados con las muestras sin tratar con K3EDTA revelan diferencias significativas ($p < 0,05$). Tomado y adaptado de: Davis C, et al. J Immunol Methods 2011.

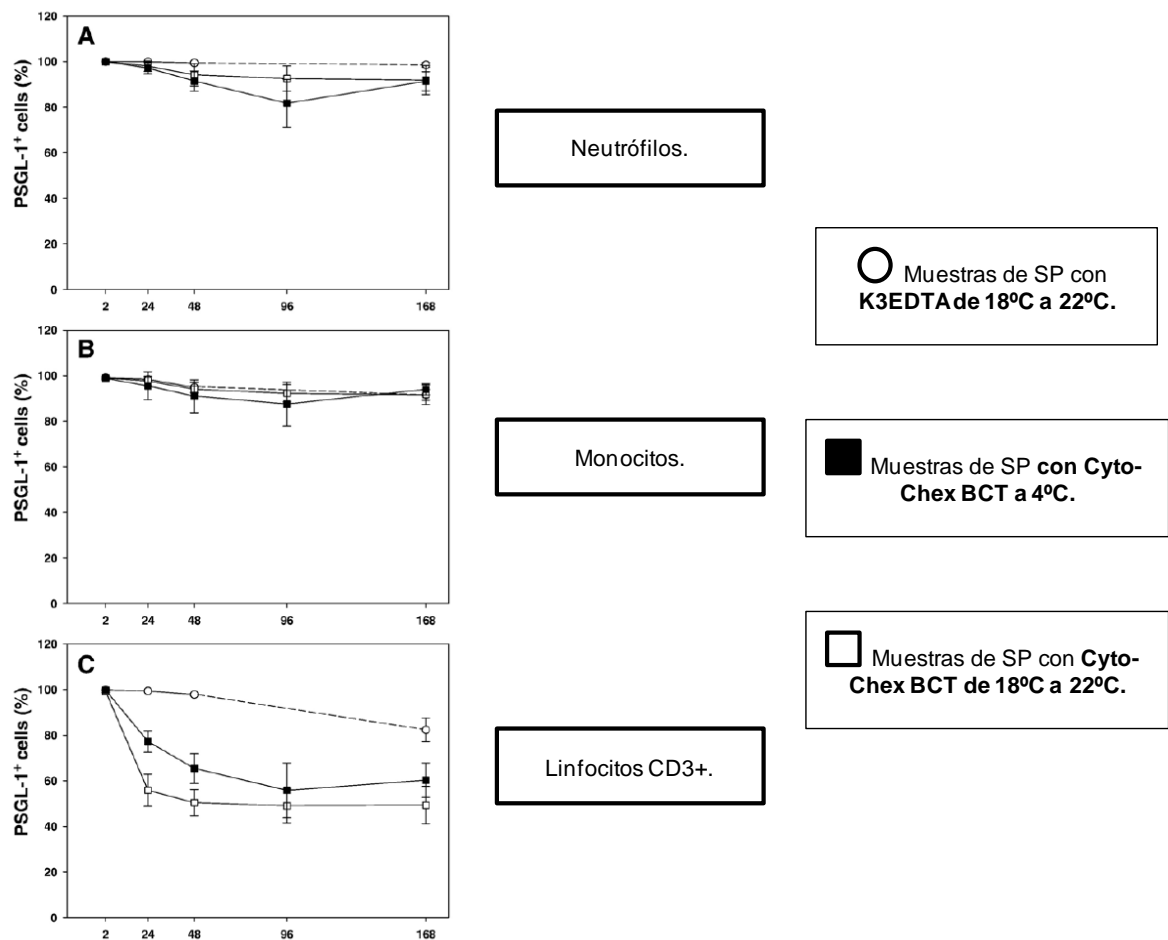


Figura 19. Efectos del estabilizante Cyto-Chex BCT en muestras de SP sobre los recuentos celulares relativos en subpoblaciones celulares de leucocitos PSGL-1+ (neutrófilos, monocitos y LTCD3+) a diferentes temperaturas de incubación por un período de 7 días post-recolección. En general en la población de neutrófilos y de monocitos se evidencia una preservación de los recuentos relativos después de 168 horas de incubación en todas las temperaturas de incubación en las muestras con Cyto-Chex BCT. De forma particular se observa que en los LTCD3+ en las muestras tratadas a temperatura ambiente desciende de forma significativa ($p < 0,05$) el porcentaje de células positivas en las primeras 24 horas tendencia que se mantiene estable hasta el día 7. Así mismo en el caso de temperaturas de refrigeración se presentó el mismo efecto pero en menor grado de impacto sobre los recuentos relativos. Por otro lado las 3 poblaciones celulares se preservan mejor en las muestras con anticoagulante K3EDTA que con el reactivo estabilizante. Tomado y adaptado de: Schumacher A. J Immunol Methods 2007.

3.4.2.1.3. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA LA EVALUACIÓN DE FSC Y SSC

Diversos trabajos centrados en la evaluación de la molécula CD11b en la población de granulocitos neutrófilos a partir de muestras de SP estabilizadas con Cyto-Chex BCT revelan que después de un período de 4 horas de almacenamiento y después de 7 días post- recolección no se evidencian efectos significativos sobre las propiedades de dispersión de la luz (evaluadas por FCS vs SSC) a temperaturas de incubación de 4°C (26). Igualmente estudios comparativos entre las muestras de donantes sanos y de pacientes HIV+ recolectadas con K3EDTA y Cyto-Chex BCT almacenados a temperaturas de 18-22°C analizadas a las 6 horas, 24 horas, 2 y 7 días demuestran que en las muestras con K3EDTA hay una pérdida de las propiedades de dispersión de la luz tan solo al día 1 ya que no se pueden definir claramente las diferentes subpoblaciones celulares (Figura 20C); mientras que en las muestras estabilizadas después de 7 días de almacenamientos se puede diferenciar y separar las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos (Figura 20H) (3). Así mismo de manera similar estos resultados se observaron en el análisis de células mononucleares de SP CD69+. En el caso de temperaturas de incubación de 30°C y 37°C las muestras con Cyto-Chex BCT permiten la diferenciación de las diferentes subpoblaciones de leucocitos a las 48 horas (detectadas por FCS y SSC). Sin embargo en las muestras con anticoagulante K3EDTA se evidenció que rápidamente las muestras se degradaban al primer día de almacenamiento.

3.4.2.1.4. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICOS

Trabajos previos en la evaluación de los efectos del tratamiento en muestras de SP con Cyto-Chex BCT sobre la expresión de CD11b en neutrófilos demuestran que el preservante previene el aumento de la IF a temperaturas de almacenamiento de 4°C después de 4 horas de incubación ex-vivo y de 7 días post recolección de las muestras. En contraste en el caso de temperaturas de 18°C a 22°C la expresión de CD11b muestra un incremento en la IF tanto en las muestras con y sin reactivo preservante (observado desde las primeras horas de almacenamiento en mayor grado en las muestras con K3EDTA) (Figura 21) (26).

Estudios en las moléculas CD8 y CD19 revelan un descenso significativo en la IF para CD8 y CD19 en las primeras 48 horas de almacenamiento en muestras con K3EDTA efecto que fue mayor cuando las muestras fueron tratadas con Cyto-Chex BCT (analizadas 1 hora post-tratamiento con preservante y 7 días de recolección) incubadas a temperatura de refrigeración (4°C) para ambas moléculas y ambiente en el caso de la molécula CD8 (18°C-22 °C) (Figura 22D). (23,25). Por otro lado para la evaluación de la IF para la PSGL-1 (CD162) en

neutrófilos, monocitos y LT CD3+ tratados con Cyto-Chex BCT se observa un descenso significativo en la fluorescencia (hasta el 50%) desde de las 2 primeras horas hasta 24 horas de almacenamiento en donde la IF para la molécula mostró ser estable hasta el día 7 cuando las muestras fueron incubadas a diferentes temperaturas (4°C, 18°C-22°C), en donde a 4°C la reducción de la IF fue más significativa que en el caso de temperatura ambiente (Figura 23). En el caso de CD16 en neutrófilos, CD3 en linfocitos y moléculas como CD4 en LT CD3+ exhiben un descenso similar en los diferentes puntos del tiempo evaluados (2, 24, 48, 96 y 168 horas post-recolección) en el que para los LTCD3+ y las células CD16+ (la IF descendió del 65% y 30% respectivamente) (Figura 22A-C). Así mismo diferencias en la IF entre las muestras con K3EDTA y con Cyto-Chex BCT después de 2 horas fue solo significativo ($p < 0,05$) para el caso de LT CD3+ y LT CD3/CD8+ (a temperatura de refrigeración y ambiente) así como para LT CD3/CD4+ (a temperatura de 18°C-22°C) pero no para el caso de la población de neutrófilos CD16+ (Figura 22A-D). De esta forma estos hallazgos permiten deducir que el reactivo preservante provoca una pérdida parcial o internalización de diferentes marcadores de superficie en diferentes poblaciones de leucocitos (25).

Evaluaciones del efecto del preservante Cyto-Chex BCT en linfocitos CD45/CD69+ indican que el porcentaje de células se preserva por 7 días en las muestras estimuladas con fitohemaglutinina purificada (PHA) a temperaturas de incubación de 18°C a 22°C (de 21,9 % en el día 1 y de 21,2% para el día 7), mientras que en el caso de las muestras con anticoagulante K3EDTA (evaluadas al día 1 y día 7) se observa un incremento en la cantidad de células positivas debido a la creciente cantidad de células muertas del 19,8% al 40,8%.

3.4.2.1.5. EFECTO DEL ESTABILIZANTE CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA (MO) Y MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL (UCB)

Estudios de aplicación publicados por Streck (Omaha, NE, USA) en muestras de MO tratadas con Cyto-Chex BCT analizadas 72 horas post-recolección a 4°C revelan que en el análisis de las diferentes subpoblaciones de leucocitos (evaluadas por CD45 vs SSC) para los diferentes CDs empleados en el diagnóstico de leucemias y linfomas la población celular CD45+ débil en leucemias (para la que se evaluó la expresión de 8 diferentes moléculas) mostraron un 20% de variación para estos CDs comparados con las muestras frescas con K3EDTA, en donde de 7/8 de los marcadores mostraron una diferencia menor del 10% (Tabla 7A). Para el caso de las células cuya IF para la molécula CD45 fue fuerte se observó que 9 de las 14 moléculas analizadas tenían una diferencia inferior del 10% con respecto a las muestras frescas con K3EDTA analizadas 6 horas post-recolección (Tabla 7B). Por otro lado en muestras de UCB con Cyto-Chex BCT se observa que hay cambios significativos en la IF para las moléculas CD19 y CD8 (observado a las 48 horas en la primera hora post tratamiento con preservante y 7 días post-recolección de la muestra) y un ligero descenso en el número de LB (después de una semana de almacenamiento). En

donde el número de LT CD3+, LT CD4+ y LT CD8+ no presentan cambios significativos cuando las muestras son incubadas a temperatura de refrigeración (23).

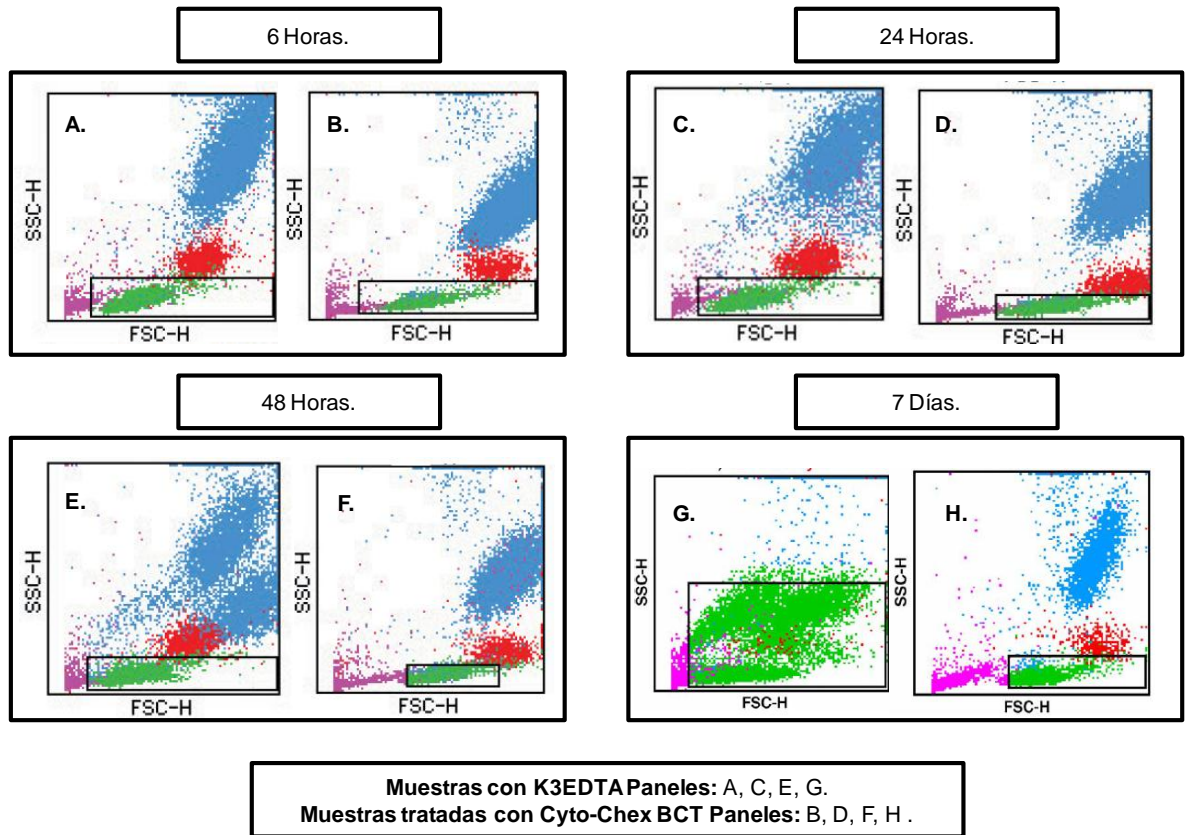


Figura 20. Dot plots bivariados de FSC vs SSC en muestras de SP tratadas con Cyto-Chex BCT y con K3EDTA incubadas temperatura ambiente por un período de 7 días. Las muestras recolectadas con K3EDTA después de 24 horas de almacenamiento muestran una pérdida de las propiedades de dispersión de la luz que aumenta con el paso del tiempo por lo que al día 7 es muy difícil la identificación celular con estos parámetros. Por el contrario el reactivo preservante Cyto-Chex BCT revela que después de 7 días se conserva el FSC y SSC de las subpoblaciones de leucocitos (neutrófilos, monocitos y linfocitos) identificadas en el primer día del estudio. Tomado y adaptado de: Warrino DE, et al. J Immunol Methods 2005.

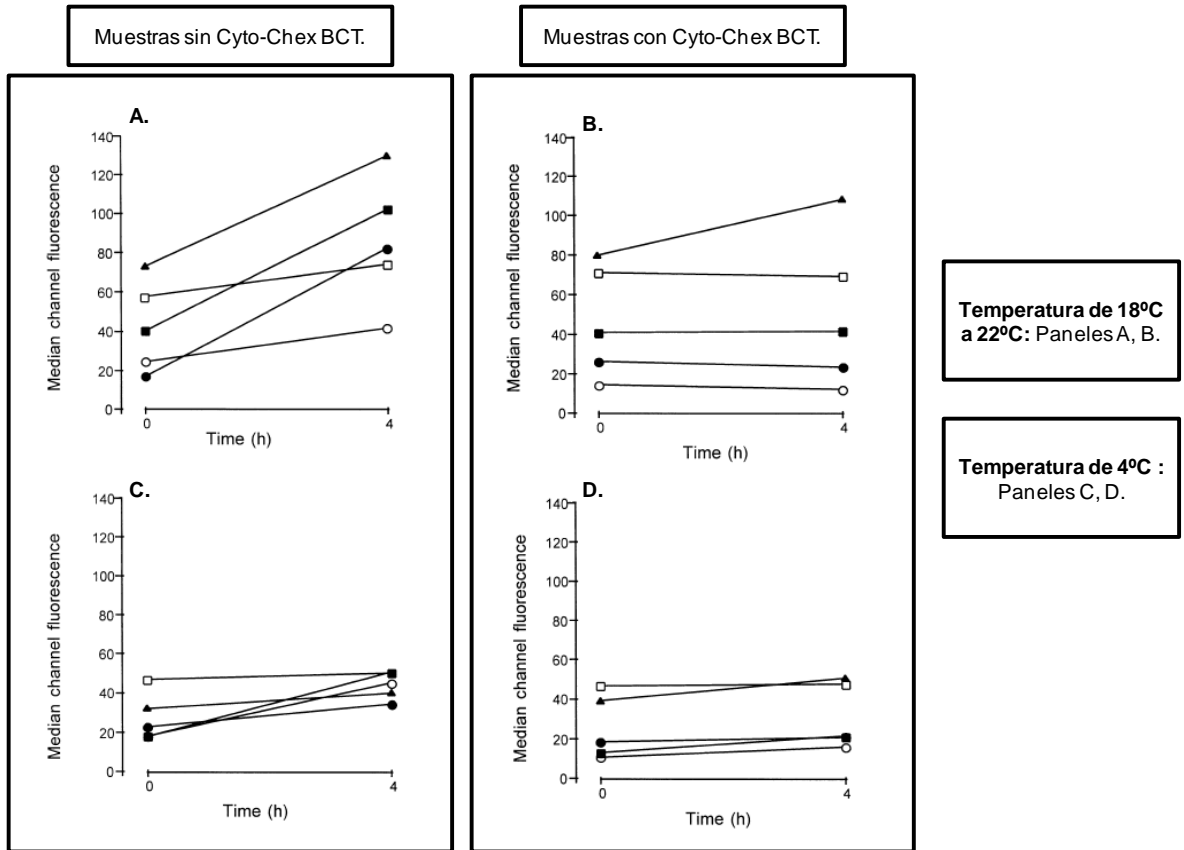
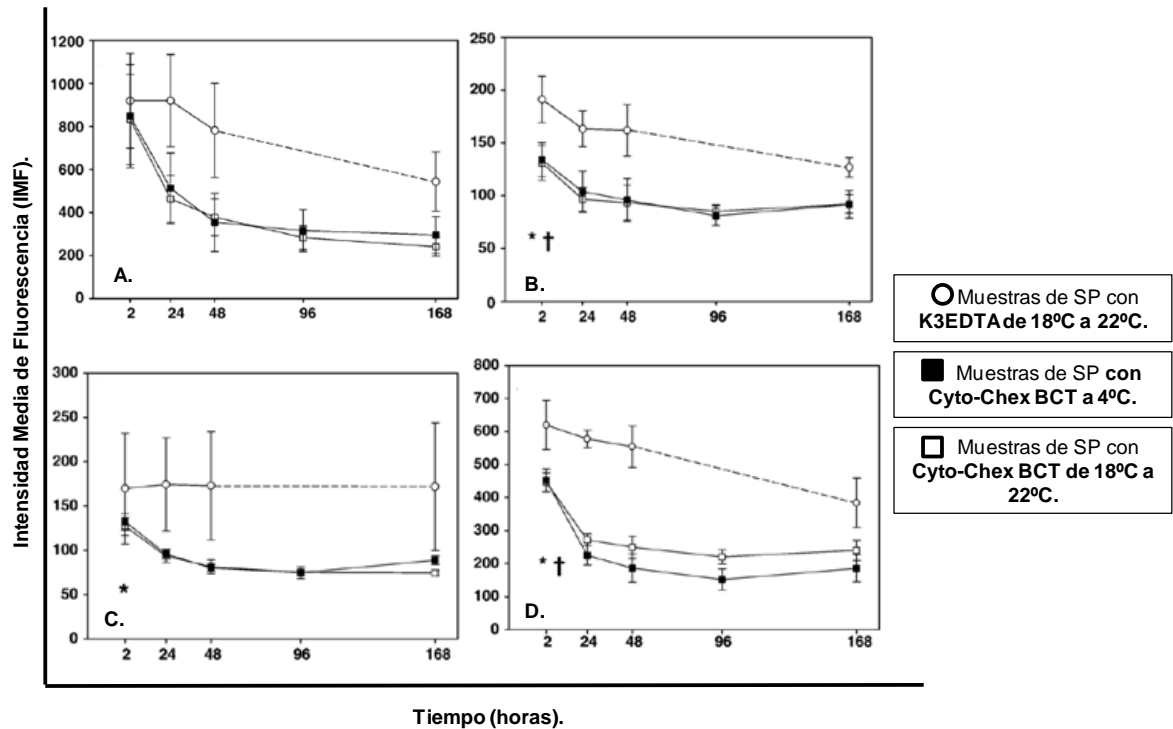


Figura 21. Evaluación de IF para la expresión de CD11b en neutrófilos de SP después 0 y 4 horas de incubación ex vivo en 5 sujetos. Las evaluaciones a temperatura ambiente (18°C a 22°C) revelan que tanto en las muestras tratadas con y sin Cyto-Chex BCT muestran aumento de la IF de la molécula CD11b ($p < 0,05$); mientras que la expresión de CD11b en las muestras almacenadas a 4°C es más estable. Tomado y adaptado de: Saxton JM, et al. J Immunol Methods 1998.



IMF para : A. Neutrófilos CD16+, B. Linfocitos CD3+, C. Linfocitos CD3/CD4+, D. Linfocitos CD3/CD8+.

Figura 22. Evaluación de la IMF en las subpoblaciones de leucocitos en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT por un período de una semana a temperaturas de refrigeración y ambiente. En general se observó un similar descenso en la IMF para todos los marcadores en los puntos del tiempo evaluados en el que solo fue significativo ($p < 0,05$) para las moléculas CD3 y CD8 cuando las muestras con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT fueron comparadas a diferentes temperaturas de incubación 4°C (+) y 18°C-22°C (*). De forma particular solo se evidencia que en el caso de los LT CD3/CD4+ esta diferencia es significativa cuando las muestras son incubadas a temperatura ambiente. Así mismo para la molécula CD16 en neutrófilos no se observa ninguna diferencia estadística significativa. Tomado y adaptado de: Schumacher A. J Immunol Methods 2007.

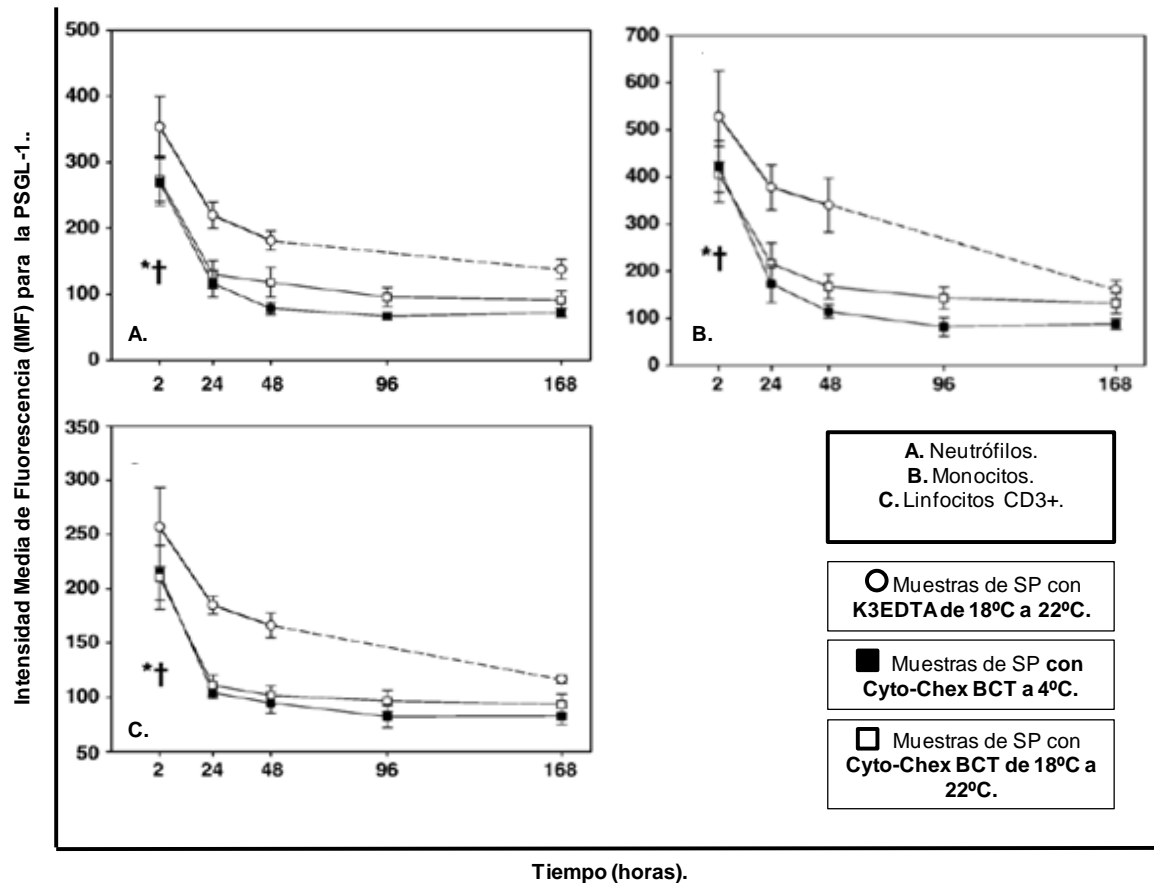


Figura 23. Evaluación de la IMF para la expresión de la PSGL-1 en muestras de SP con K3EDTA y tratadas con Cyto-Chex BCT almacenadas por un período de 7 días a diferentes temperaturas de incubación. Análisis comparativos entre las muestras con Cyto-Chex BCT y K3EDTA muestran un descenso significativo ($p < 0,05$) de la fluorescencia para la PSGL-1 en las poblaciones celulares evaluadas (neutrófilos, monocitos y LT CD3+) a diferentes temperaturas de incubación 4°C (+) y 18°C-22°C (*) siendo de mayor proporción a temperaturas de refrigeración. Tomado y adaptado de: Schumacher A. J Immunol Methods 2007.

Tabla 7. Evaluación de los porcentajes de células positivas para diferentes CDs empleados en leucemias en muestras de MO sin tratar (evaluadas 6 horas post-recolección) y con Cyto-Chex BCT (evaluadas a las 72 horas post-tratamiento) a 4°C.

A. Población celular CD45+ débil.			
7 Patients	<u>K2EDTA</u>	<u>Cyto-Chex</u>	<u>% difference</u>
<u>AVERAGES</u>	6 hour	3 Day	3D Cyto-Chex Vs. K2EDTA
45+/14- %	93	90	-3.2
Total 33%	46	47	2.2
33+/13+ %	35	37	5.3
Total 34 %	31	29	-7.8
34+/13+ %	15	14	-3.8
Total HLA-DR %	50	46	-8.3
CD13+/HLA-DR+	23	21	-6.9
CD34+/CD117+	18	15	-15.3

B. Población celular CD45+ fuerte.			
5 Patients	<u>K2EDTA</u>	<u>Cyto-Chex</u>	<u>% difference</u>
<u>AVERAGES</u>	6 hour	3 Day	3D Cyto-Chex Vs. K2EDTA
45+/14- %	98.4	92.0	-6.5
19+/3- %	6.3	5.3	-16.0
3+/19- %	66.3	61.0	-7.9
19+/20+ %	5.8	5.0	-13.0
19+/38+ %	2.0	2.0	0.0
19+/10+ %	2.0	2.0	0.0
5+/19+ %	2.0	2.0	0.0
5+/19- %	68.0	59.8	-12.1
19+/23+ %	2.0	1.6	-20.0
2+/7+ %	75.8	69.8	-7.9
3+/4+ %	38.0	34.3	-9.6
3+/8+ %	31.7	27.3	-13.7
19+/Kappa+ %	44.0	41.6	-5.5
19+/Lambda+ %	27.6	29.0	5.1

NOTA: Para realizar el cálculo del porcentaje de diferencia entre las muestras comparadas se debe aplicar la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\text{Rto absoluto muestras con Cyto-Chex BCT (14 días)} - \text{Rto absoluto muestras con K3EDTA}}{\text{Rto absoluto muestras con K3EDTA} \times 100\%}$$

Resultado relevante: Para la población celular CD45+ débil se observa que de los marcadores evaluados las poblaciones celulares CD34/CD117+ revelan una diferencia mayor al 10%. En el caso de las células CD45+ fuerte muestran que 5 de los 14 CDs evaluados tienen una diferencia mayor al 10% mientras que en el caso de los linfocitos CD19/CD20+, CD19/CD38+, CD19/CD5+ no se presenta ninguna diferencia significativa entre las muestras tratadas con Cyto-Chex BCT y K3EDTA.

3.5. TRABAJOS CONJUNTOS CON LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX BCT

3.5.1. EFECTO DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX BCT EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE RECUENTOS CELULARES ABSOLUTOS EN LAS SUBPOBLACIONES DE LEUCOCITOS

Recientes trabajos en 2012 en un estudio de 4 donantes sanos evalúan el impacto de la fijación de las muestras de SP sobre los recuentos celulares absolutos con los reactivos preservantes Transfix y Cyto-Chex BCT almacenadas por un período de 10 días a temperaturas de 18°C a 22°C en donde el mejor estabilizante fue Cyto-Chex BCT ya que preservó los recuentos celulares en la mayoría de las poblaciones celulares en mayor proporción que con respecto a las muestras tratadas con Transfix y sin tratar (con K3EDTA); así Transfix a pesar de no ser el preservante ideal, en el caso de los recuentos celulares de la población de células dendríticas (DC de origen mieloide (mDC) BDCA3+o CD141 y plasmocitoides o pDC) y LT CD8+ llega a ser el adecuado estabilizante si se compara con las muestras sin tratar. De igual modo se encontró que Transfix fue el mejor reactivo preservante en la población celular CD1c+ (también llamado BDCA1) (34). También se determinó el impacto del almacenamiento a temperatura de 4°C en ausencia de algún tratamiento previo de estabilización en las muestras durante el mismo período de tiempo en donde se observó 4 grupos diferentes de poblaciones celulares los cuales fueron clasificados dependiendo de los perfiles cinéticos de los recuentos celulares, partiendo del grupo de las células menos estables donde se encontraron los tipos celulares más raros (mDC, pDC) y granulocitos hasta las más estables (monocitos CD14+ y CD14+/CD16-, células natural killer o NK CD56+ y CD56+/CD16+) (Figura 24I-IV) (27).

3.5.2. EFECTO DE LOS ESTABILIZANTES TRANSFIX Y CYTO-CHEX EN MUESTRAS DE SP PARA EVALUACIÓN DE MARCADORES INMUNOFENOTÍPICOS

Análisis conjuntos de los efectos de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT sobre la expresión de diversos marcadores inmunofenotípicos apuntan que el Transfix conservó de manera más óptima varios marcadores CDs (como CD4, BDCA1 o CD1c, BDCA3, CD123, CD19, etc.). Mientras que el preservante Cyto-Chex BCT mostró una estabilización de poblaciones celulares como BDCA3+, pDC, entre otras. De modo que en general comparando los dos estabilizantes el mejor preservante de las diferentes moléculas evaluadas fue el Transfix, sin embargo se ha reportado que el empleo de este reactivo causa un incremento en la permeabilidad de membrana de las células hecho que se refleja con el aumento de la IF para 7AAD (resultados que también se evidencian en el estudio realizado por Cannonico et al en 2004 con IP que indica que la población que mejor se preservó fueron los linfocitos). Por consiguiente el Cyto-Chex BCT es el reactivo

de elección de uso con estudios de viabilidad celular a temperatura ambiente por un período de 10 días (Figura 25). Cabe destacar que de todos los marcadores CD evaluados en este estudio el único de naturaleza intracelular (FOXP3) reveló que con ninguno de los reactivos estabilizantes se conservó, pero que con paraformaldehído al 1% (PFA) se detectó después de 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Figura 26) (27).

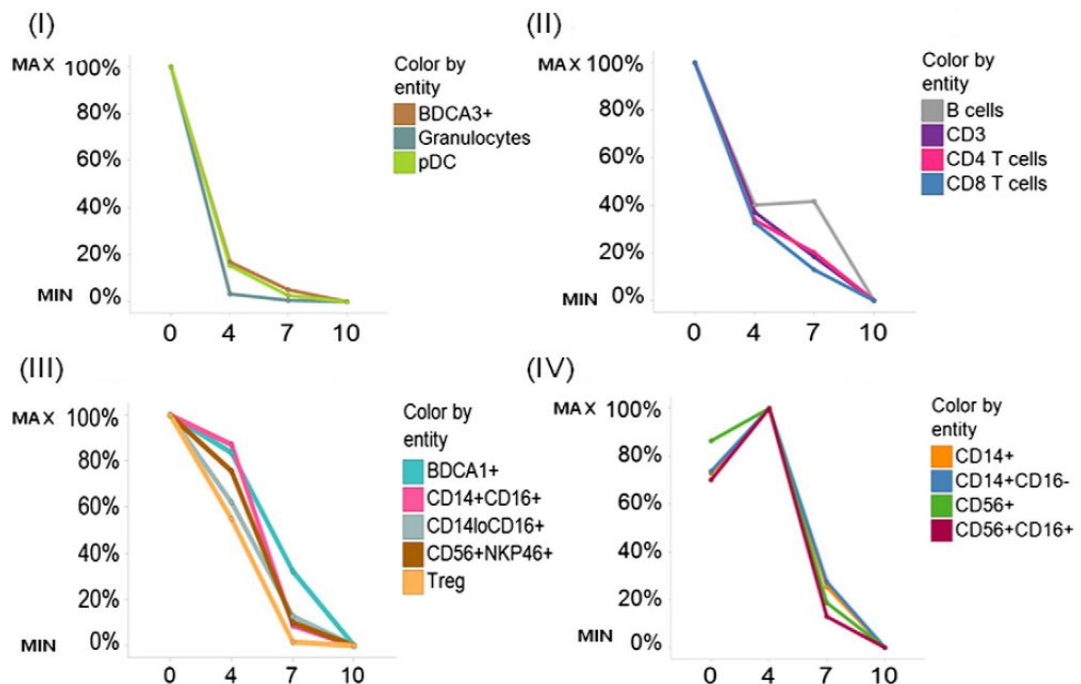


Figura 24. Impacto del almacenamiento sobre los recuentos celulares en muestras SP con K3EDTA incubadas a 4°C por un período de 10 días. El almacenamiento a temperatura ambiente de las muestras sin tratar revela que se pueden distinguir 4 grupos diferentes clasificados de acuerdo a su estabilidad con el paso del tiempo en donde cabe destacar que los recuentos celulares en los tipos celulares menos comunes BDCA3+ en mDC (células dendríticas de origen mieloide), pDC (células dendríticas plasmocitoides) así como de los granulocitos son los más inestables después de 4 días de almacenamiento. Por otro lado dentro de la población de células analizadas que se encontraron que fueron más estables se puede incluir a los monocitos CD14+, monocitos CD14+/CD16+, células NK CD56+ y CD56/CD16+ ya que muestran que los recuentos celulares no descienden de forma significativa en los primeros 4 días pero que para el día 7 los recuentos son significativamente menores con respecto al día 0. Tomado de: A.P. Ng A, et al. J Immunol Methods 2012.

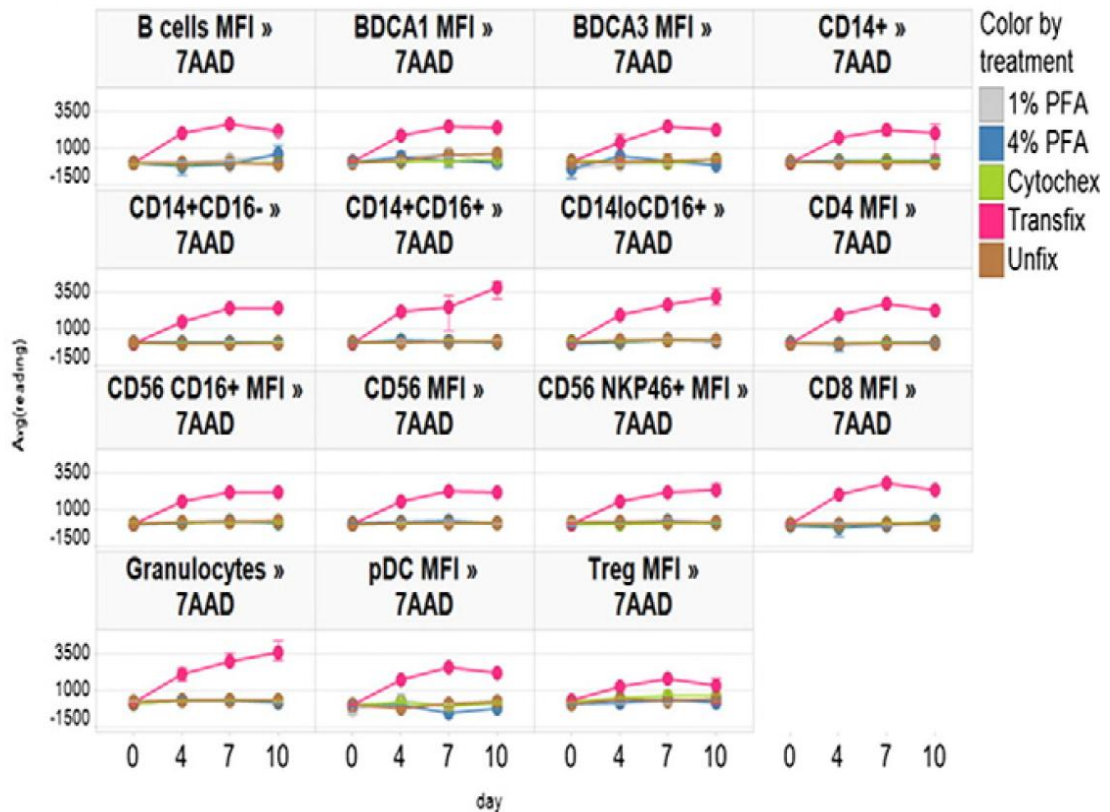


Figura 25. Evaluación de la IMF para la molécula 7-AAD en muestras de SP tratadas con Transfix y Cyto-Chex BCT analizadas en diferentes puntos del tiempo por un período de 10 días a temperatura ambiente. En general los resultados muestran que las muestras tratadas con Transfix con el paso del tiempo aumentan significativamente la IMF ($p < 0,05$) para 7-AAD en todas las poblaciones celulares analizadas, esto es debido a la naturaleza del reactivo el cual se ha descrito que puede aumentar la permeabilidad de la membrana de las células tratadas. Por el contrario tanto en las muestras con PFA, Cyto-Chex BCT y con K3EDTA se mantienen de manera similar los promedios de células positivas para esta molécula ($p > 0,05$). Tomado de: A.P. Ng A, et al. J Immunol Methods 2012.

	1% PFA	4% PFA	Cyto- chex	Transfix
7AAD	0.4	0.33	0.6	0
BDCA1	0	0	0	0
BDCA2	0	0	1	0
BDCA3	0	1	1	1
CD11b	0	0	0.13	0.63
CD11c	0	0	0	0
CD123	1	0	1	1
CD127	0	1	1	0
CD14	0.25	0	0.25	0.25
CD16	0	0	0.2	0.2
CD19	0	0	0	1
CD20	0	0	0	0
CD25	0	0	1	0
CD3	0	0	0.67	0.33
CD4	0	0	0	1
CD45	0.29	0.21	0.57	0.71
CD45RA	0.33	0.33	0.67	1
CD45RO	0.5	0.5	0.5	0.5
CD49D	0	0	0	0
CD56	0	0	0.67	0.67
CD62L	0.13	0.25	0	0.5
CD66	0	0	0	1
CD8	0	0	0	0
CD80	1	1	0.67	1
CD86	0	0.25	0	0.75
FOXP3	1	0	0	0
HLADR	0	0	0.38	0.25
NKP46	0	0	0	0

PFA 1%: Paraformaldehído al 1%.
PFA 4% : Paraformaldehído al 4%.

Convenciones.

Casillas verdes (1): Tratamiento **ÓPTIMO** con reactivo preservante ($p > 0,05$) comparado con las muestras no fijadas al día 0.

Convenciones.

Casillas blancas (0): Resultados después de estabilización **NO ÓPTIMO** ($p < 0,05$) comparado con los resultados de las muestras con K3EDTA en el día 0.

Figura 26. Impacto de los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT en la expresión de diferentes marcadores CDs evaluados a temperatura ambiente por un período de 10 días. Análisis comparativos entre las muestras tratadas con Transfix, Cyto-Chex BCT y las muestras no tratadas revelan que el reactivo Transfix preserva la mayoría de las moléculas evaluadas ($p > 0,05$) a excepción de casos específicos en donde el estabilizante Cyto-Chex BCT mostró mejores resultados (CD25, BDCA2, etc.) con respecto a las muestras con Transfix y no tratadas. Por otro lado en diversas moléculas (CD20, CD49D, CD8, FOXP3, etc.) evaluadas entre las muestras tratadas y no tratadas indican que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre si ya que la estabilidad para la expresión de estos marcadores CDs no se conserva en con ninguno de los reactivos estabilizantes. De forma particular se observa que en los marcadores no conservados cuando son fijados con PFA al 1% y al 4% se conservan después de 10 días (FOXP3, CD123, etc). Tomado y adaptado de: A.P. Ng A, et al. J Immunol Methods 2012.

4. CONCLUSIONES.

- En cuanto a la evaluación de recuentos celulares relativos y absolutos se observa que el estabilizante Cyto-Chex BCT (principalmente empleado en la rutina clínica para la monitorización de recuentos CD4+ y CD8+ en pacientes HIV+ post-tratamiento) es el más efectivo para la preservación de poblaciones linfocitarias de sangre periférica por períodos de tiempo superiores a una semana.
- En cuanto a la evaluación de los parámetros de FSC y SSC estos parámetros se conservan al utilizar los estabilizantes Transfix y Cyto-Chex BCT en permitiendo realizar la diferenciación de las diferentes subpoblaciones celulares de leucocitos presentes en muestras de sangre periférica.
- El estudio de la IMF de distintas moléculas presentes de forma diferencial en poblaciones leucocitarias como CD45, CD3, CD4 y CD38, entre otras en muestras tratadas con Transfix muestra que la expresión de estas moléculas es estable hasta después de 7 días de tratamiento. Además la expresión de marcadores celulares que no se usan comúnmente en la rutina clínica (p. ej. BDCA3, CD66 y CD80) es más estable con Transfix en comparación con las muestras tratadas con Cyto-Chex BCT.
- Con el estabilizante Cyto-Chex, se reporta que algunos antígenos no se conservan con el estabilizante ya que este puede inducir algún tipo de internalización de algunos antígenos asociados a activación celular (p. ej. PSGL-1), demostrando que se tienen que seguir realizando estudios con nuevos reactivos que se puedan aplicar a este tipo de moléculas.
- El análisis de la viabilidad celular (mediante evaluación de la captación supravital de colorantes fluorescentes como IP, 7-AAD o por el método del TÚNEL) muestra que la población celular con mayor viabilidad es la población linfoide tanto en las muestras tratadas con Transfix como en las estabilizadas con Cyto-Chex BCT y la población más susceptible a muerte es la de granulocitos neutrófilos. Además el estabilizante Transfix induce defectos en la membrana de los glóbulos rojos después de 2 días de almacenamiento a 4°C, evidenciado por la tinción con Anexina V.)
- Estudios morfológicos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) revelan que con Transfix la población de linfocitos después de 10 días de almacenamiento a diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 37°C) preservan estructuras como la membrana citoplasmática y celular. De forma particular en la población de GR después de 12 días de almacenamiento a 4°C se evidencia la morfología típica en esta población celular (disco bicóncavo). Por otra parte, la población de granulocitos neutrófilos es de tipo necrótico en comparación con los neutrófilos de muestras sin tratar.

- Muestras de origen biológico como el LCR deben ser estabilizadas de forma inmediata durante la obtención para evitar el deterioro de las células debido a los rápidos efectos citotóxicos observados en los leucocitos in vitro, lo cual permitiría que tras su análisis por CMF se incremente la sensibilidad en la detección de poblaciones leucocitarias y células tumorales.
- El trabajo de aplicación en muestras de MO tratadas con Cyto-Chex BCT revela que este tipo de muestras pueden ser estables hasta por 3 días después de su recolección a 4°C. No existen estudios reportados en la literatura que muestren el efecto del estabilizante Transfix en MO.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Saavedra C, Quijano S, Romero M, Jaramillo R, Orduz R, Echeverri C, et al. Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de trastornos hematológicos. *Biomédica* 2010; 30(Supl):11-21.
2. Orfao, A. La Citometría de Flujo en el Laboratorio Clínico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Capítulo 1 1995: 11-51.
3. Warrino DE, DeGennaro LJ, Hanson M, Swindells S, Pirruccello SJ, Ryan WL. Stabilization of white blood cells and immunologic markers for extended analysis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2005; 305(2):107-119.
4. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 2000 46:8(B) 1221–1229.
5. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26:1908–1975.
6. Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry. *Clinical Cytometry Society* 2007; 72B:S23–S33.
7. Dayis B, Holden J, Bene M, Borowitz M, Braylan R, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Clinical Cytometry Society* 2007; 72B:S5–S13.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
9. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc 2008; Supplement 45: 6.25.16.25.16.

10. Quijano S, López A, Manuel SJ, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol* 2009; 27:1462-1469.
11. Ahluwalia M S, Wallace P K, Peereboom D M. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. *Cancer* 2012; 118:1747-1753.
12. Wood B, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick S, et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Clinical Cytometry* 2007; 72B:S14–S22.
13. Ruiz A, Rivadeneyra L, Duque R, Orfao A and behalf of the participants of the Latin American Consensus Conference. Report on the second latin american consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Clinical Cytometry* 2005; 70B:39–44.
14. Ruiz A, Duque R and Orfao, A. Report on the first latin american consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Clinical Cytometry* 1998; 34:39–42.
15. Braylan R, Orfao A, Borowitz M, Davis B. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Clinical Cytometry* 2001; 46:23–27.
16. Canonico B, Zamai L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, et al. Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *J Immunol Methods* 2004; 295(1–2):67-78.
17. Jani IV, Janossy G, Iqbal A, Mhalu FS, Lyamuya EF, Biberfeld G, et al. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry: II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. *J Immunol Methods* 2001; 257(1–2):145-154.
18. Bergeron M, Shafaie A, Ding T, Phaneuf S, Soucy N, Mandy F, et al. Evaluation of stabilized blood cell products as candidate preparations for quality assessment programs for CD4 T-cell counting. *Cytometry* 2002; 50(2):86-91.
19. Canonico B, Betti M, Luchetti F, Battistelli M, Falcieri E, Ferri P, et al. Flow cytometric profiles, biomolecular and morphological aspects of transfixed

leukocytes and red cells. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2010; 78B (4):267-278.

20. Bikoue A, Janossy G, Barnett D. Stabilised cellular immuno-fluorescence assay: CD45 expression as a calibration standard for human leukocytes. *J Immunol Methods* 2002; 266(1–2):19-32.
21. Miranda M.B, Dyer K.F, Grandis J.R, Johnson D.E. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-XL and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia* 2003; 17:390-400.
22. Hoymans V Y, Van Craenenbroeck A H, Bruyndonckx L, van Ierssel S H, Vrints C J, Conraads V M et al. TransFix for delayed flow cytometry of endothelial progenitor cells and angiogenic T cells. *Microvascular Research* 2012; 84:384-386.
23. Schumacher MJ, Burkhead T. Stability of fresh and preserved fetal and adult lymphocyte cell surface markers. *J Clin Lab Anal* 2000; 14(6):320-326.
24. Davis C, Wu X, Li W, Fan H, Reddy M. Stability of immunophenotypic markers in fixed peripheral blood for extended analysis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2011; 363(2):158-165.
25. Schumacher A. Effect of ex vivo storage and Cyto-Chex on the expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on human peripheral leukocytes. *J Immunol Methods* 2007; 323(1):24-30.
26. Saxton JM, Pockley AG. Effect of ex vivo storage on human peripheral blood neutrophil expression of CD11b and the stabilizing effects of Cyto-Chex; *J Immunol Methods* 1998; 214(1-2):11-17.
27. A.P. Ng A, T.K. Lee B, S.Y. Teo T, Poidinger M, Connolly J E. Optimal cellular preservation for high dimensional flow cytometric analysis of multicentre trials; *J Immunol Methods* 2012; 385 (1-2):79-89.