



**ESTUDIO DE MUESTRAS ESPECIALES POR CITOMETRÍA DE FLUJO: EXPERIENCIA EN EL
HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO-PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

LAURA CAROLINA TRUJILLO CAJAMARCA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2013

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. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, por todas las bendiciones recibidas y las venideras.

A mis padres Benjamín y Myriam por su apoyo absoluto, a ellos he de agradecerles quien soy y seré siempre.

A mis hermanos Camilo y Fabian que aunque no pareciese sé que se la alegran por mis triunfos, también me han sabido guiar en este camino.

Johana, Camilo son quienes han sabido sacarme esa sonrisa que se necesita en momentos de impaciencia.

A la Doctora Sandra Quijano, ha sido una maestra, una guía y un ejemplo a seguir; por todo lo enseñado hasta el momento, por la paciencia, compañía, las risas, llamados de atención y momentos vividos.

A mis compañeros de academia, me han enseñado diversas formas de ver la vida, colaboraron en mi crecimiento personal y académico, no habría escogido mejor compañía.

A Paula, Christian, Leidy y Keyi, por tantas enseñanzas, risas, regaños. Pasé y espero seguir pasando momentos inolvidables junto a ustedes.

Milena, Carolina, solo tengo que decirles gracias infinitas, fueron un gran apoyo.

Jhonnathan Sanchez; todo lo que quisiera decirte se resume en: "Tener un amigo, es una gracia. Conservar un amigo, es una virtud; **ser tu amigo, es, ¡un honor!**". GRACIAS TOTALES.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. FORMULAICON Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
4. MARCO TEÓRICO.....	8
5. OBJETIVOS.....	9
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
5.2. OBEJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
6. METODOLOGIA	10
7. RESULTADOS	10
7.1. PROTOCOLO EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS ESPECIALES (LÍQUIDOS BIOLÓGICOS) POR CMF EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO.....	10
8. ANALISIS DE RESULTADOS.....	16
8.1 MUESTRAS DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR).....	18
8.2 MUESTRAS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA).....	19
8.3 MUESTRAS DE LIQUIDO PLEURAL.....	20
8.4 ANALISIS DE OTRAS MUESTRAS ESPECIALES.....	21
8.4.1 LIQUIDO PERITONEAL.....	21
8.4.2 LIQUIDO SINOVIAL.....	21
8.4.3 LIQUIDO PERICARDICO.....	22
8.4.4 LIQUIDO ASCITICO.....	22
8.5 ESTUDIO DE BIOPSIAS.....	22
8.5.1 BIOPSIAS DE GANGLIO LINFATICO.....	22
8.5.2 BIOPSIAS ABDOMINALES.....	22
8.5.3 BIOPSIAS SIN ESPECIFICACIÓN DE SITIO ANATÓMICO DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	22
8.5.4 BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA.....	23
8.5.5 BIOPSIA DE TESTICULO.....	23
8.5.6 BIOPSIA DE PULMON.....	23
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	24
10. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. RESUMEN

La citometría de flujo ha evolucionado de forma importante en Colombia durante la última década, empleándose en gran medida en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Desde el año 2008 en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana y posteriormente en el Hospital Universitario San Ignacio se empezó a implementar esta herramienta en muestras de tejidos especiales distintas a médula ósea y sangre periférica, que debían ser estabilizadas con “Transfix” para asegurar la calidad de las mismas. Esta implementación ha contribuido de manera relevante en la mejor clasificación, seguimiento y diagnóstico de diversos tipos de tumores que tienen la capacidad de hacer migración y/o metástasis a distancia o para detectarlos en su tejido de origen. En el presente trabajo reportamos el protocolo de marcaje y los resultados de 916 muestras especiales que incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), lavado broncoalveolar, líquido pleural, líquido ascítico, líquido Pericárdico y biopsias de tejidos sólidos que se evaluaron en el servicio de citometría de estas dos instituciones para apoyar la clasificación y la detección de infiltración tumoral o no de leucemias agudas y crónicas, Síndromes Mielodisplásicos, linfomas, mieloma, linfoma de Hodgkin, procesos infecciosos, autoinmunes, inmunodeficiencias y tumores sólidos entre otros. De forma relevante, la mayoría de muestras especiales enviadas por los Hemato-Oncólogos correspondieron a LCR para el seguimiento de pacientes con leucemia linfocítica aguda B. En general observamos en este análisis que la implementación de esta herramienta ha tenido un crecimiento exponencial aportando información muy útil desde el punto de vista de diagnóstico y seguimiento de los pacientes y además muy importante en la toma de decisiones terapéuticas que impactan sin duda en el pronóstico de la enfermedad. Adicionalmente se demuestra que la CMF es muy sensible ya que detecta cantidades mínimas de células tumorales y/o normales en los tejidos evaluados. Este trabajo representa el primer reporte en el país de implementación de la CMF en muestras estabilizadas.

2. INTRODUCCION

La citometría de flujo (CMF) representa una herramienta diagnóstica fundamental para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con diversos tipos de enfermedades como neoplasias hematológicas, tumores sólidos, enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias, entre otras. Una de las muchas ventajas de la CMF es que se puede realizar en diferentes tipos de muestras biológicas que incluyen médula ósea (MO), sangre periférica (SP), aféresis, cordón umbilical, biopsias de tejido y líquidos corporales, etc (1-5). A partir del año 2008 en el Servicio de Citometría de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana se empezó a implementar el estudio de muestras especiales mediante CMF, posteriormente el servicio se trasladó al Hospital Universitario San Ignacio donde este proceso ha tenido continuidad y en la actualidad se evalúan muestras de líquidos corporales de pacientes pediátricos y adultos con diversas enfermedades que requieren una correcta clasificación;

adicionalmente el servicio es prestado a diversas instituciones del país debido a que en general existe poca experiencia y entrenamiento en este tipo de análisis. Esta implementación ha representado un avance importante para el país en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes que padecen alguno de los trastornos antes mencionados. Hasta la fecha, no se habían documentado los resultados de esta implementación lo que permite describir los protocolos de procesamiento de las muestras, las estrategias de análisis y los tipos de tumores o condiciones patológicas donde se requiere evaluación de estas muestras.

3. FORMULACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Desde su aparición, la CMF ha sufrido un importante desarrollo debido en gran medida a que por su carácter multidisciplinario se ha beneficiado de los avances ocurridos en los últimos años en campos diversos como la informática, la producción de nuevas clonas anticuerpos monoclonales, la gran disponibilidad de nuevos fluorocromos, la estandarización de los procesos de tinción de las muestras, la electrónica, la óptica y la tecnología láser (1). Así, esta tecnología en un principio sofisticada y restringida a laboratorios de investigación básica ha pasado a estar presente en los últimos años en la rutina de muchos laboratorios clínicos de gran complejidad. En la actualidad, la CMF es una herramienta de alta especificidad y sensibilidad indispensable en el análisis de diferentes muestras biológicas de pacientes en el momento del diagnóstico y en el seguimiento de enfermedades oncológicas y otras que incluyen inmunodeficiencias primarias y secundarias, procesos infecciosos, seguimiento pre y post-trasplante, etc (1, 5). En nuestro medio, los estudios por CMF se realizan de forma adecuada en pocas instituciones de alta complejidad que cuentan con el recurso humano altamente calificado. Esta herramienta clínica ha contribuido de forma relevante en la detección de poblaciones tumorales que infiltran diversos tipos de tejidos como es el caso de la afectación del sistema nervioso central por células tumorales, una de las más frecuentes complicaciones de los pacientes con trastornos hematológicos que se asocia a mayor agresividad y peor pronóstico. En comparación con los estudios morfológicos, la CMF al detectar poblaciones tumorales mínimas es recomendada para realizar un diagnóstico seguro y evitar el reporte de falsos negativos (1-2, 4-6).

Un aspecto de gran relevancia en la fase pre-analítica de los estudios por CMF, es la calidad de la muestra que se relaciona con la celularidad de la misma, la viabilidad, el volumen, el tiempo entre su obtención, transporte y procesamiento hasta el laboratorio. Muestras “especiales” como es el caso de líquidos corporales requieren del uso de estabilizantes para preservar las características de las células por periodos prolongados de tiempo, con el fin de no reportar resultados falsos negativos por pérdida de viabilidad y/o celularidad (4-6). Dentro de los estabilizantes de uso comercial más difundidos en la actualidad en los laboratorios de CMF es el reactivo TransFix™, cuyo uso y aplicación ha sido validado y reportado en la literatura en muestras biológicas de SP y líquido cefalorraquídeo principalmente (4, 6). Debido a lo anterior, a partir del año 2008 en Colombia sólo

dos instituciones prestadoras de servicios en CMF comenzaron a implementar el estudio de muestras especiales y líquidos corporales en condiciones de calidad mediante el uso de estabilizantes; dentro de estas instituciones se encuentra el servicio de citometría de la Pontificia Universidad Javeriana que posteriormente fue trasladado al Hospital Universitario San Ignacio lo que ha representado un avance muy importante en nuestro país para el mejor diagnóstico, clasificación y seguimiento de pacientes con cáncer del Centro Javeriano de Oncología y de otras instituciones que remiten sus pacientes.

En el presente trabajo documentamos los hallazgos de los estudios de muestras especiales mediante CMF en un periodo de 5 años en la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio. Este estudio será de gran utilidad para socializar a otros laboratorios de CMF los protocolos adecuados de obtención, procesamiento y análisis de estas muestras y además a la comunidad médica para conocer el comportamiento de diversos tipos de enfermedades en cuanto a las frecuencias de infiltración tumoral, la celularidad de las muestras, la respuesta al tratamiento de los pacientes, los momentos clínicos de evaluación, etc.

4. MARCO TEÓRICO

Dentro de los parámetros de laboratorio recomendados por la Organización Mundial de la Salud para la adecuada clasificación y para el seguimiento de neoplasias de origen hematológico como leucemias y linfomas, es necesario el estudio de muestras de médula ósea, sangre periférica u otros tejidos afectados por la enfermedad mediante morfología, CMF, citogenética convencional y técnicas moleculares, entre otras (7-9). La CMF es una técnica de análisis multiparamétrico que se fundamenta en el paso de una suspensión celular contenida en un volumen determinado a través de uno o varios láser; La información generada que depende de parámetros como la dispersión de la luz y de la fluorescencia es captada por varios detectores capaces de recoger y medir características físico - químicas de estas poblaciones celulares (1, 10). Es una tecnología que permite la medida de diferentes parámetros de una misma célula de manera simultánea, incluyendo tamaño y complejidad interna y las asociadas con la luz generada como consecuencia de la presencia en la célula de anticuerpos conjugados con fluorocromos (1). Por otra parte esta técnica identifica y cuantifica antígenos de la superficie celular e intracitoplasmáticos cuya expresión está rigurosamente regulada a lo largo de la diferenciación y maduración de las células stem hematopoyéticas a células maduras funcionales de la sangre periférica (5, 7, 10). Esta herramienta tiene grandes ventajas que incluyen una gran sensibilidad, objetividad, rapidez y versatilidad analítica, lo que permite su aplicación en áreas diversas como la detección y cuantificación de células tumorales, la monitorización de diferentes procedimientos terapéuticos, la cuantificación de ácidos nucleicos, el análisis de cromosomas, el estudio del contenido proteico, de la producción celular de radicales de oxígeno, del

potencial de membrana, de las mitocondrias, el análisis de los cambios intracitoplasmáticos de determinados iones como el Ca^{++} , entre otros (5, 10-11).

Otra de las grandes ventajas de la CMF, es que se puede implementar en diversos tipos de muestras biológicas, incluyendo médula ósea (MO), sangre periférica (SP), aféresis, cordón umbilical, biopsias de tejido y líquidos corporales (LCR, LBA, Líquido Sinovial, Líquido Pleural, Líquido peritoneal, etc), estos últimos muy importantes en el presente trabajo, ya que requieren de condiciones especiales de conservación y transporte en la fase pre-analítica para mantener en condiciones de calidad las muestras antes de su procesamiento en el servicio de citometría (5, 10-11).

De acuerdo a lo reportado por la OMS en el 2008 (8-9) la citometría de flujo es una herramienta fundamental en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de pacientes que padecen enfermedades hematológicas, infecciones, inmunodeficiencias, entre otras (10); hasta ahora en nuestro medio no se encuentran reportes de hallazgos documentados en los laboratorios que colaboren en la realización de un consenso epidemiológico de las entidades que más incidencia tienen en nuestro país; por lo que es importante realizar dicho documento con las muestras recolectadas, así contribuimos a la extensión de nueva y valiosa información para la comunidad a cargo de la salud.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Documentar los hallazgos de los estudios de muestras especiales por CMF en un periodo de 5 años en el servicio de citometría de la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar una base de datos de todas las muestras de líquidos corporales que se han evaluado por CMF desde 2008-2013 en la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio.
- Describir las recomendaciones técnicas del procesamiento y análisis de estas muestras en la fase pre-analítica y analítica por CMF para su posterior aplicación en los laboratorios de citometría.
- Describir en las diferentes muestras estudiadas los recuentos absolutos y relativos de poblaciones celulares normales y tumorales, volúmenes de muestra, tipos de enfermedades evaluadas y momento clínico del estudio de los pacientes.

6. METODOLOGIA

Se realizó una base de datos que incluye la información de todas las muestras especiales de líquidos corporales que han sido procesados y estudiados desde el mes de junio de 2008 hasta el mes de octubre de 2013 en el servicio de citometría de la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio. Esta base contiene información como sexo, edad, enfermedad de base, tipo de muestra, volumen, celularidad, porcentaje de infiltración tumoral y momento clínico de los pacientes (diagnóstico, seguimiento post-quimioterapia o irradiación, recaída, progresión).

Se aplicaron medidas estadísticas como incidencia, frecuencia, proporción así como también el uso de tablas y gráficos que ilustran datos de interés. Se implementó una base de datos en Excel; los datos obtenidos fueron analizados en SPSS Versión 17 y graficados en el programa.

7. RESULTADOS

7.1 PROTOCOLO EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS ESPECIALES (LÍQUIDOS BIOLÓGICOS) POR CMF EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN IGNACIO

En el Consenso Colombiano de CMF realizado en el año 2008 y publicado en 2010 en Biomédica, se recomienda que las muestras de líquidos corporales específicamente las de LCR sean estabilizadas desde el momento de su obtención con el estabilizante comercial Transfix validado en estudios previos⁵. Este estabilizante retrasa el proceso de muerte celular y permite el análisis de las muestras hasta por periodos superiores a 7 días. En el servicio de citometría de la Pontificia Universidad Javeriana y posteriormente en el Hospital Universitario San Ignacio se ha implementado en todas las muestras especiales. Este estabilizante es adicionado a las muestras inmediatamente después de su obtención o disgregación en el caso de las biopsias de tejido sólido en una dilución 1/10(6). Una vez obtenidas las muestras, estas deben ser transportadas al laboratorio o mantenidas en frío a una temperatura de 4°C.

En la fase pre-analítica en el servicio de CMF para el procesamiento de estas muestras estabilizadas se aplica en la rutina el siguiente protocolo:

- I.** Medir el volumen total de muestra recibida y documentar.
- II.** Adicionar al tubo 1-2 mL de PBS para realizar un lavado de muestra.
- III.** Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm para concentrar las células.
- IV.** Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur o con micropipeta.
- V.** Adicionar 300 µl-1000 ul de PBS estéril al pellet celular.
- VI.** Transferir a otro tubo 150 µl de la muestra y guardar en nevera el volumen de muestra restante.

- VII.** Según la pregunta clínica realizar el marcaje de las muestras con el panel de anticuerpos apropiado para responder la pregunta del médico solicitante (Tabla 1).
- VIII.** Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- IX.** Adicionar 0.5-1.0 ml de solución de lisis de eritrocitos.
- X.** Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- XI.** Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
- XII.** Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur o con micropipeta.
- XIII.** Resuspender el pellet celular en 0.3 ml de PBS y adicionar 50 µl de esferas fluorescentes con el fin de realizar los recuentos absolutos de las diferentes poblaciones celulares presentes en la muestra.
- XIV.** Mezclar y adquirir todo el volumen de muestra en el Citómetro de flujo *FACS Canto II BDB*.
- XV.** El análisis se realiza empleando el software multiparamétrico Paint-A-Gate BDB (Figuras 1-5).
- XVI.** Para calcular el número absoluto de cada subpoblación celular, se aplicó la siguiente fórmula.^{7,8}

Dónde:

- a) El número total de microesferas añadidas al tubo se calcula de la siguiente forma: volumen de microesferas añadidas al tubo (por ejemplo, 20 uL) x concentración de microesferas (microesferas/u) (este dato lo provee el fabricante).
- b) Volumen total de la muestra en el momento de su obtención.

$$\frac{\text{\# Células en el gate}}{\text{\# de microesferas en el gate}^a} \times \frac{\text{\# microesferas añadidas por tubo}^a}{\text{volumen de muestra (ul)}^b} \times \text{factor de conversión}^c = \text{Células/uL}$$

- c) El factor de corrección será igual al volumen inicial de la muestra (p.ej., 5000 ul) dividido por el volumen de la muestra concentrada utilizada para el marcaje en cada tubo (p.ej. 100ul). Así, en el protocolo descrito el factor de corrección será: 5000ul/100ul= 50.

XVII. Reporte del análisis.

Para el análisis de biopsias de tejidos y dependiendo del tamaño de la misma, se disgregaba mecánicamente con pinzas estériles y solución salina estéril o se procesaba en el equipo disgregador de tejidos *medimachine* de la casa comercial BDB. El volumen de la suspensión celular obtenida era medido y documentado y se procedía con el mismo protocolo descrito anteriormente desde el paso 3.

Tabla 1. Paneles de anticuerpos empleados para el análisis de muestras especiales por CMF

Pregunta Clínica	FITC	PE	PERCP	PECY7	APC	APCCY7	Esferas
LNH	Lambda	Kappa	CD19	CD3	CD14	CD45	+
Pacientes HIV+	Lambda	Kappa	CD19	CD3	CD14	CD45	+
LLA-B	CD34/TdT	CD10	CD19	CD3	CD14	CD45	+
LMA	CD34	CD117	CD19	CD3	CD14	CD45	+
LLA-T	CD7/TdT	CD5	CD34	CD3	CD14	CD45	+
Linfoma de Hodgkin	CD30	CD200	CD3	CD38	CD14	CD45	+
Mieloma	cyLambda	cyKappa	CD19	CD38	CD138	CD45	
Tumores Sólidos	CD34	CD56/CD117	CD3	CD38	CD14	CD45	+

Cy: hace referencia a marcaje de antígenos citoplasmáticos. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, peridina clorofila proteína; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC-Cy7.

Figura 1. Muestra de LCR de paciente con Linfoma sin infiltración tumoral

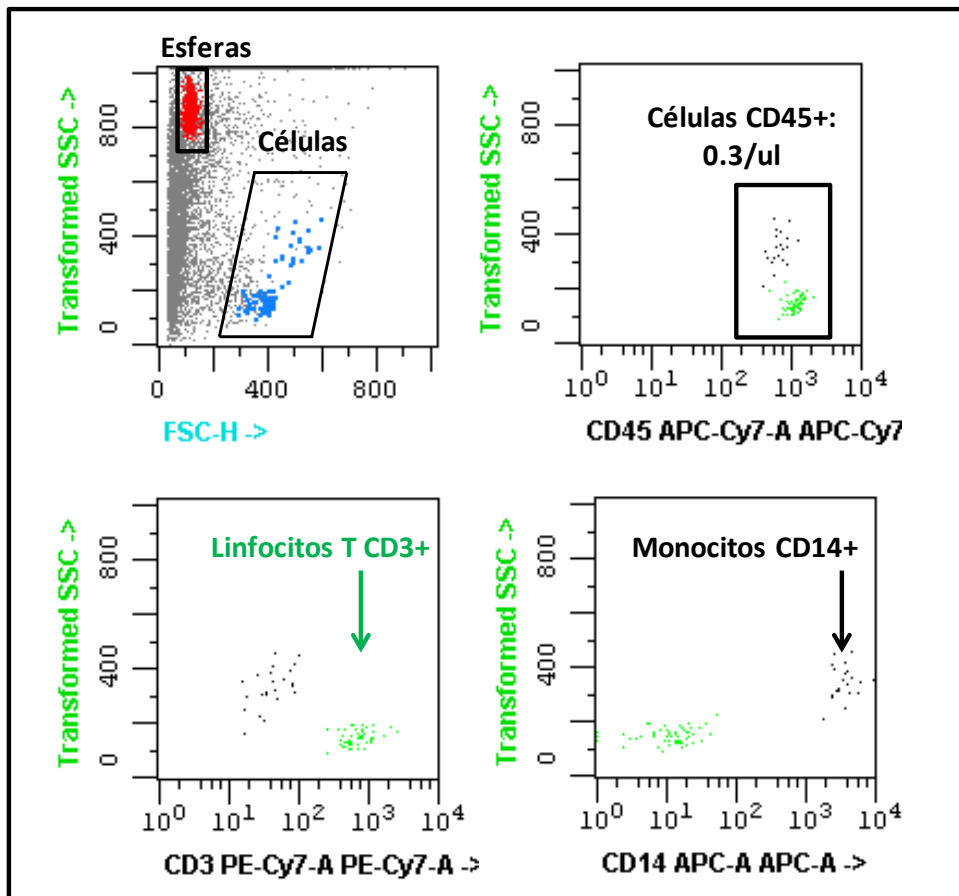


Figura 1. Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de linfoma, en el que no se detectaron células tumorales. En esta muestra se detectaron linfocitos T CD3+/CD45+ y monocitos CD14+/CD45+. En el dot plot de Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- se representa la selección de la población de esferas y de las células.

Figura 2. Muestra de LCR de paciente con Linfoma con

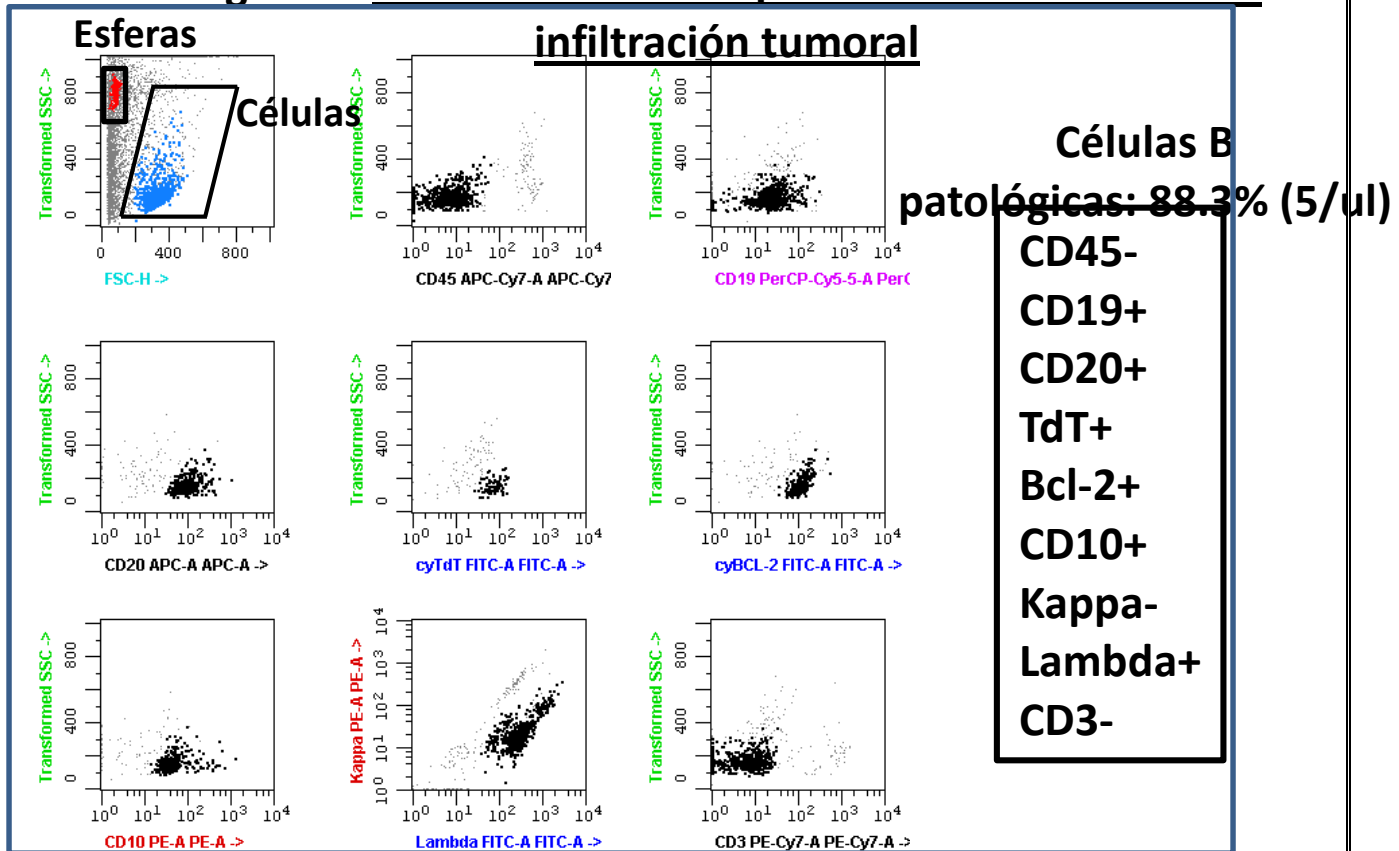


Figura 2. Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de linfoma Linfoblástico B, en el que se detectaron células tumorales (88.3% que equivalen en números absolutos a 5 células/ul y representadas de color negro). En el dot plot de Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- se representa la selección de la población de esferas y de las células.

Figura 3. Muestra de LCR de paciente con Leucemia Mieloide Crónica en Crisis Blástica

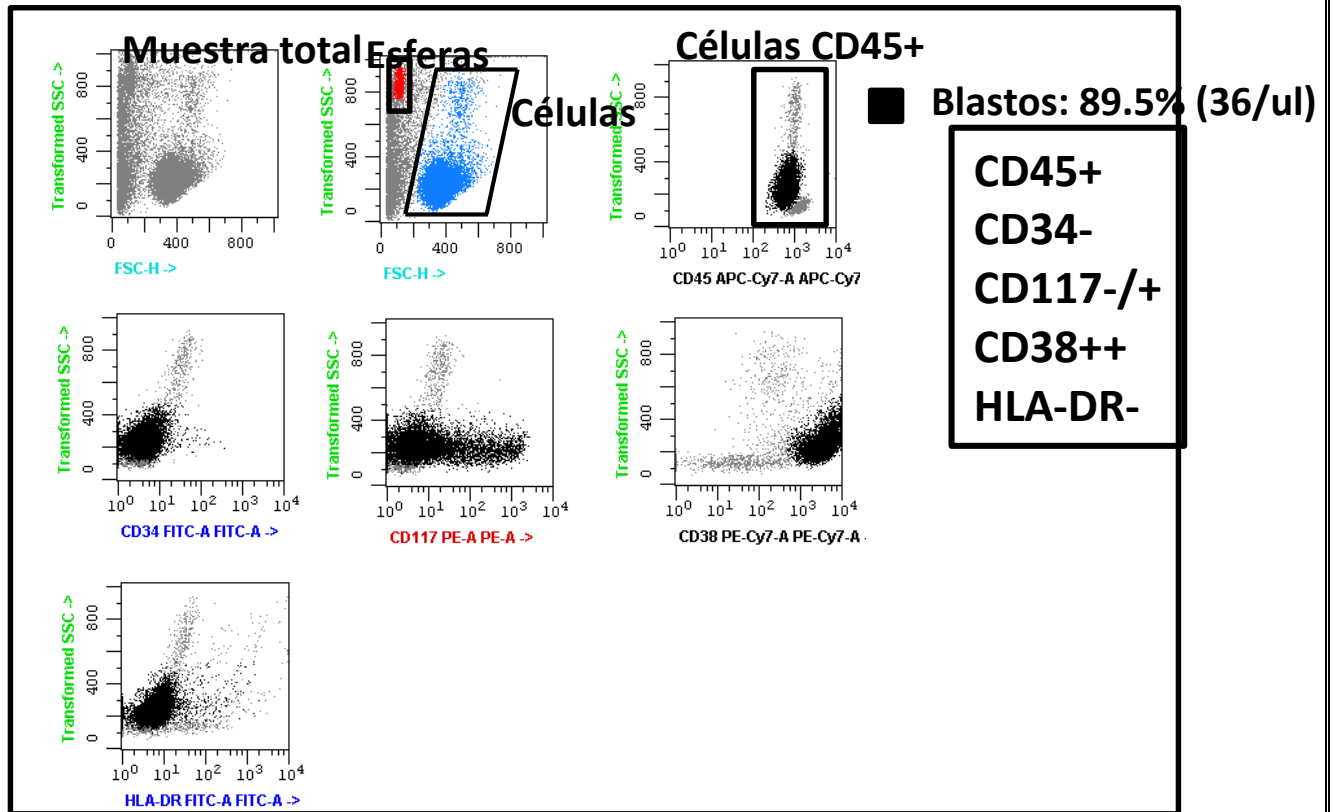


Figura 3. Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica en evolución a Crisis Blástica e infiltración tumoral en sistema nervioso central (89.5% de blastos que equivalen en números absolutos a 36 células/ul y representados de color negro). En el dot plot de Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- se representa la selección de la población de esferas y de las células.

Figura 4. Muestra de Líquido Pleural de paciente con sospecha de neoplasia negativo para infiltración tumoral

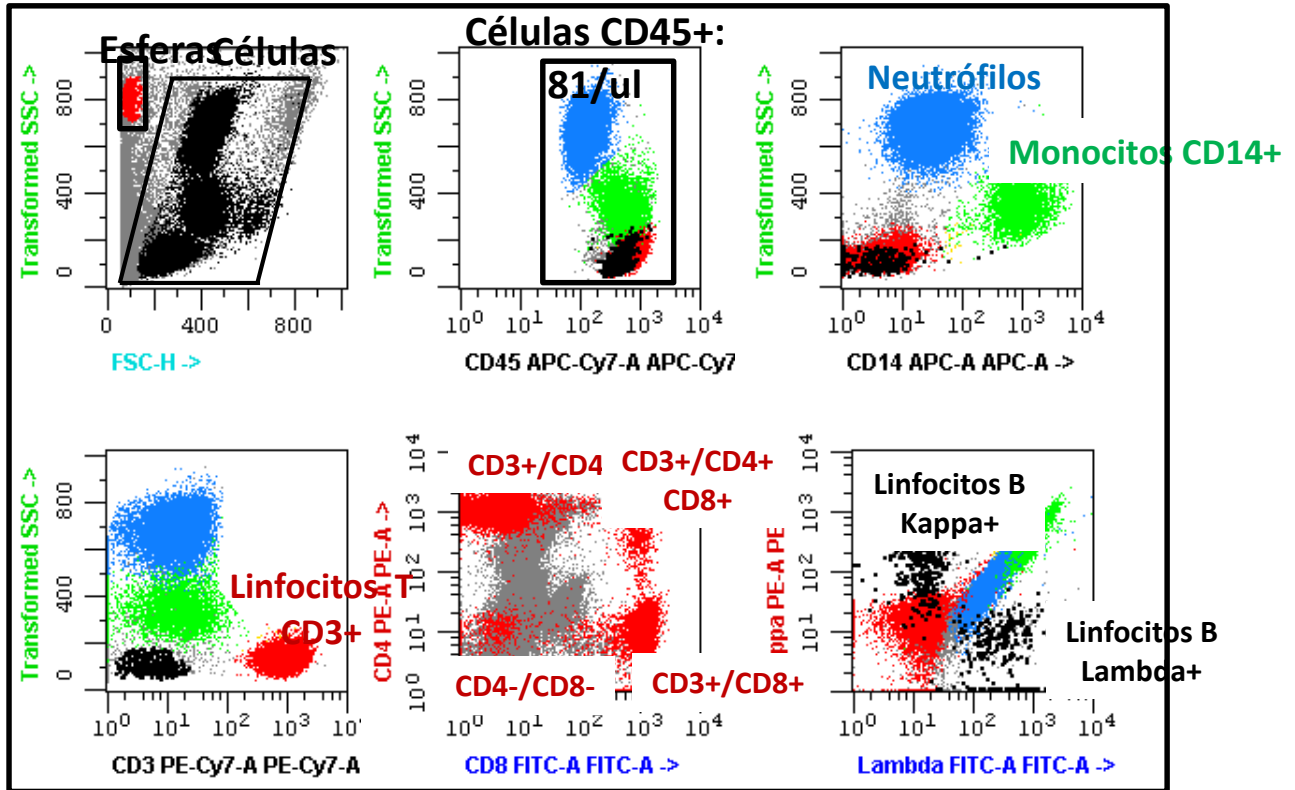


Figura 4. Representación del análisis de una muestra de líquido pleural de un paciente con sospecha de neoplasia. En esta muestra no se detectaron células tumorales y se evidenciaron neutrófilos (color azul), monocitos CD14+ (color verde), linfocitos T CD3+ (color rojo) distribuidos en células CD4+/CD8-, CD8+/CD4-, CD4+/CD8+ y CD4-/CD8- y linfocitos B policlonales Kappa+ y Lambda+ (color negro). El total de células en esta muestra es de 81 células/ul. En el dot plot de Side Scatter – SSC- vs. Forward Scatter –FSC- se representa la selección de la población de esferas y de las células.

Figura 5. Muestra de Líquido Pleural de paciente con Linfoma positivo para infiltración tumoral

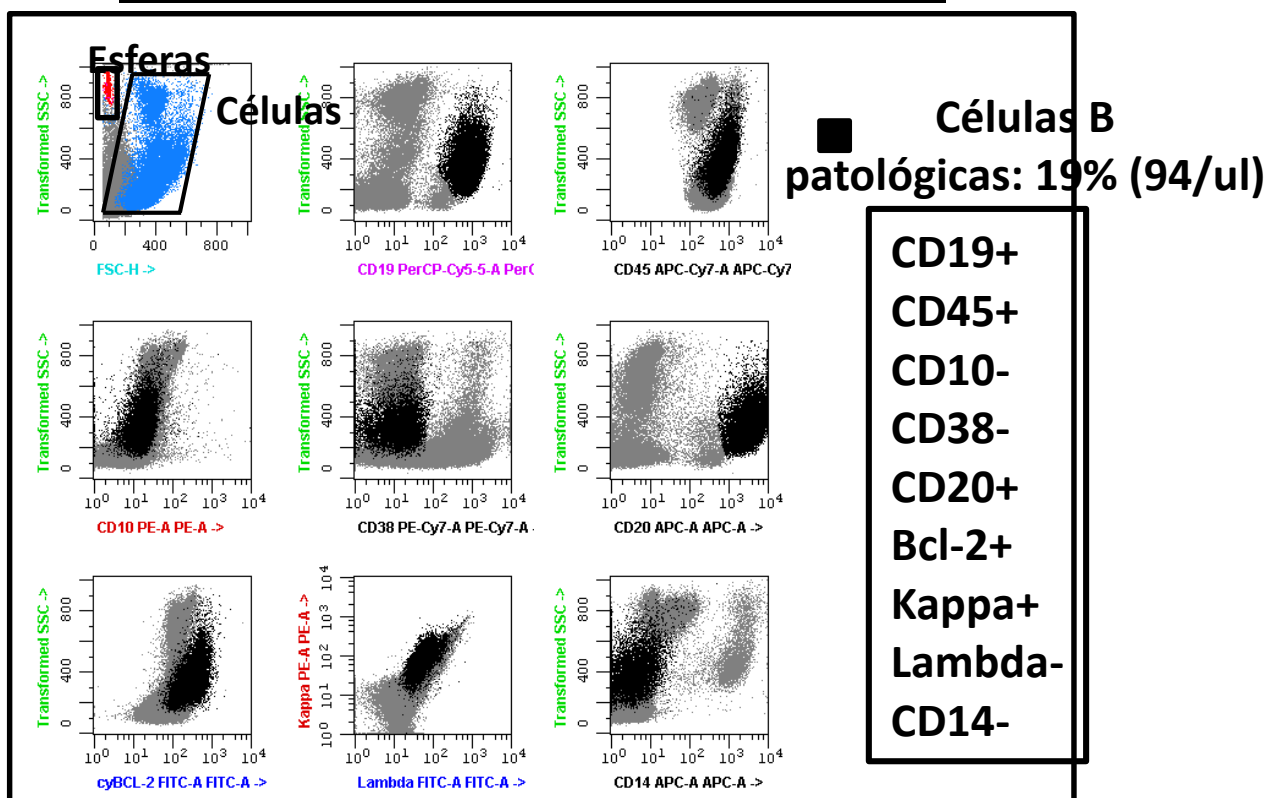


Figura 5. Representación del análisis de una muestra de líquido pleural infiltrado por linfoma de células B en el que se detectaron células tumorales del 19% que equivalen en números absolutos a 94 células/uL y representadas de color negro. En el dot plot de Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- se representa la selección de la población de esferas y de las células.

8. ANALISIS DE RESULTADOS

Entre Junio de 2008 y Octubre de 2013 se analizaron en total 916 muestras especiales de pacientes de sexo masculino 571 (62%) y 345 muestras de pacientes de sexo femenino (38%). La edad promedio de los pacientes fue de 38 años con un rango entre 1 a 86 años.

La mayoría de muestras correspondieron a LCR (88.2% de los casos), con menor representación de lavados broncoalveolares, líquidos pleurales y biopsias de tejido sólido, entre otros (Tabla 2). Los volúmenes de muestra variaron entre 0.2 ml (en el caso de LCR) hasta 60 ml (en el caso de líquido pleural) (Tabla 2). Todas las muestras analizadas estaban estabilizadas con Transfix.

TABLA 2. Tipos de muestra analizados en el servicio de citometría del Hospital Universitario San Ignacio y volúmenes de muestra recibidos.

Tipo de muestra	N° de casos	Volumen promedio (ml)	Volumen rango (ml)
LCR	811	1.3	0.2-8.3
Lavado Broncoalveolar	14	3.2	1.3-6.8
Líquido Pleural	68	3.2	0.5-60
Líquido Ascítico	2	3.5	1.7-5.4
Líquido Peritoneal	2	4.4	4.1-4.8
Líquido Sinovial	1	2.5	-
Líquido Pericárdico	1	3.2	-
Biopsias	17	-	-

Estas muestras correspondieron a pacientes con leucemia linfoide aguda B y T, leucemia mieloide aguda, Linfomas no Hodgkin, Linfoma de Hodgkin, pacientes VIH+ y otras patologías incluyendo tumores sólidos o pacientes con síntomas neurológicos. El momento clínico en el cual se analizaron las muestras fueron: Diagnóstico (30%), Seguimiento (65%), Recaída (4.4%) o Progresión (0.6%) (Figura 6).

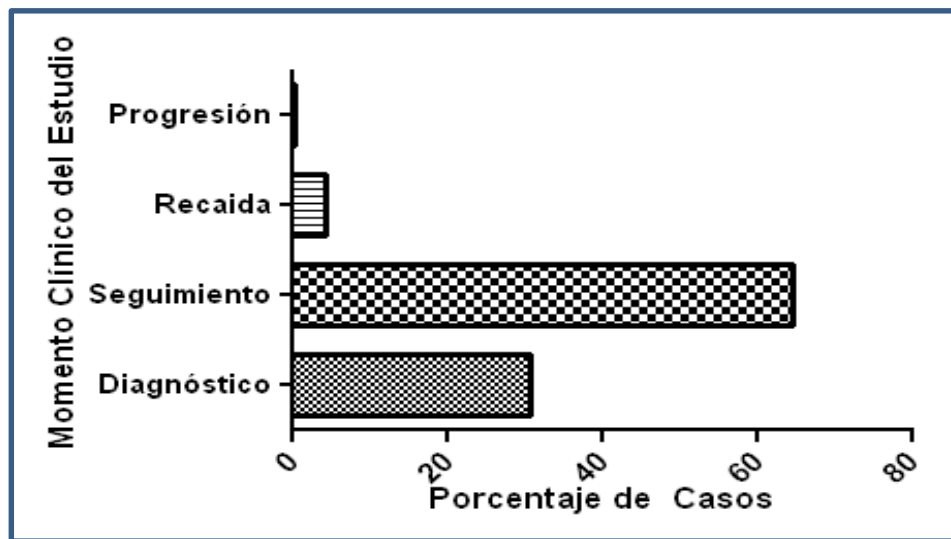


Figura 6. Momento clínico del estudio de las 916 muestras especiales procesadas en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana o en el Hospital Universitario San Ignacio en un periodo de 5 años.

8.1 ANALISIS DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR)

El total de muestras de LCR analizadas fue de 811 y la patología más frecuentemente evaluada es infiltración o no por blastos de Leucemia Linfóide Aguda de células B (56.1% de los casos), seguido de casos de Linfoma no Hodgking (25%) (Figura 7). Algunos casos que se recibieron como meningoencefalitis, procesos autoinmunes, procesos infecciosos o tumores sólidos fueron incluidos como "Otros" y representaron 5.9% del total de muestras de LCR (48 muestras).

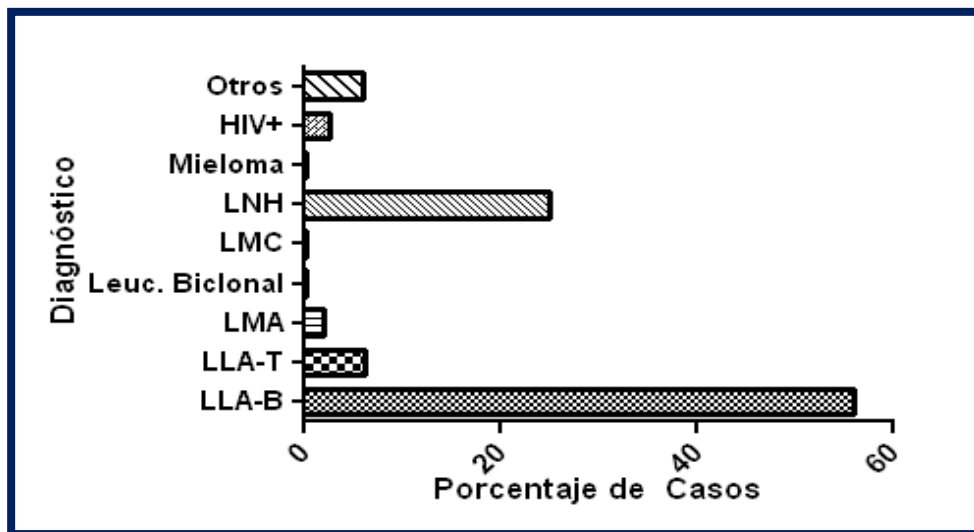


Figura 7. Tipo de patología evaluada en muestras de LCR.

Del total de muestras de LCR, se encontró que el 20% se encontraban infiltradas por células tumorales y el 80% restante estaban libres de infiltración. En general, los LCR con infiltración tumoral mostraron mayor número de células totales/ μ l que incluían linfocitos T y monocitos (Tabla 3)

Tabla 3. Números absolutos de poblaciones celulares detectados en muestras de LCR sin y con infiltración tumoral.

Parámetro evaluado	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/ μ l	18	0 -3022	156	0.06 – 4816
Blastos/ μ l	-	-	73	0.01 - 1683
Linfocitos B patológicos/ μ l	-	-	46	0.01 - 638
Linfocitos T patológicos/ μ l	-	-	0.06	0.06 – 0.06
Linfocitos T/ μ l*	9	0-1873	52	0.02-1940
Monocitos/ μ l*	4.2	0.4-100	37	0-3477
Neutrófilos/ μ l	32	0.02-1820	76	0.03-1277

*p<0.01

En relación a la calidad de las muestras de LCR, se encontró que 133 muestras estaban contaminadas con sangre periférica (16%).

8.2 ANALISIS DE MUESTRAS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Se evaluaron en total 14 muestras de LBA (1.5%) las cuales se envían principalmente para el estudio de infiltración por Linfomas (42.9%), seguido de Leucemias Linfoides Agudas B (28%). El 14% de los casos se clasificó como "Otros" e incluyó muestras de pacientes con sarcoidosis y linfadenopatías (Figura 8). Después del análisis de los casos se encontró que el 78.6% de las muestras fueron positivas para infiltración tumoral respecto a un 21.4% de casos no infiltrados.

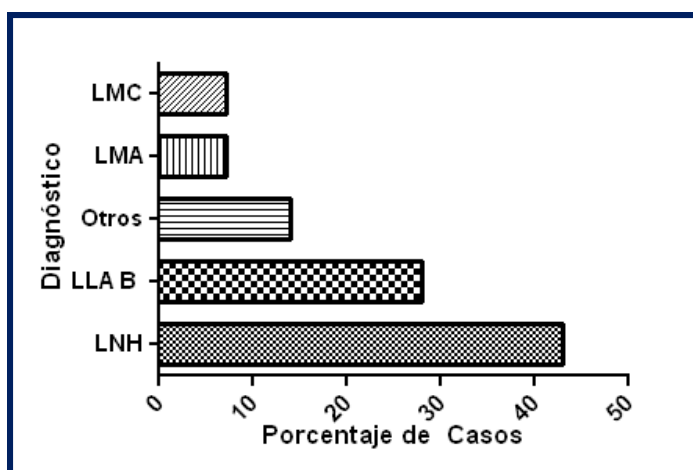


Figura 8. Tipos de patologías evaluadas en muestras de LBA

En la tabla 4 están representados los valores absolutos de las diferentes poblaciones celulares detectadas en las muestras de LBA. No se encontraron diferencias significativas en el número de células T y monocitos al comparar las muestras infiltradas respecto a las no infiltradas.

Tabla 4. Números absolutos de poblaciones celulares detectados en muestras de LBA sin y con infiltración tumoral.

Parámetros evaluados	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/ μ l	1539	0.6-16087	242	7.7-603
Blastos/ μ l	-	-	0.23	0.23-0.23
Linfocitos B patológicos/ μ l	-	-	69	0.15-138
Linfocitos T/ μ l	33.8	0.08-149	121	2.3-313
Monocitos/ μ l	88.1	0.14-563	59	0.3-118
Neutrófilos/ μ l	1945	0.7-15475	11.4	4.8-18

Linfocitos B/ μ l	0.54	0.54-0.54	6	6
Células NK/ μ l	1.51	0.36-2.34	6	6
Células plasmáticas/ μ l	-	-	3.99	2.41-5.56

En relación a la calidad de las muestras de LBA, se observó que ninguna estaba contaminada con sangre.

8.3 ANALISIS DE MUESTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL

Se evaluaron en total 68 muestras de líquido pleural y de forma similar a las muestras de LBA, estas fueron enviadas principalmente para el estudio de infiltración tumoral por Linfomas No Hodgkin (55.8%), seguidas de casos clasificados como "Otros" que incluyeron procesos infecciosos, tumores sólidos, citopenias, derrames pleurales y EPOC entre otros. Estos casos equivalen al 20.6% del total (Figura 9)

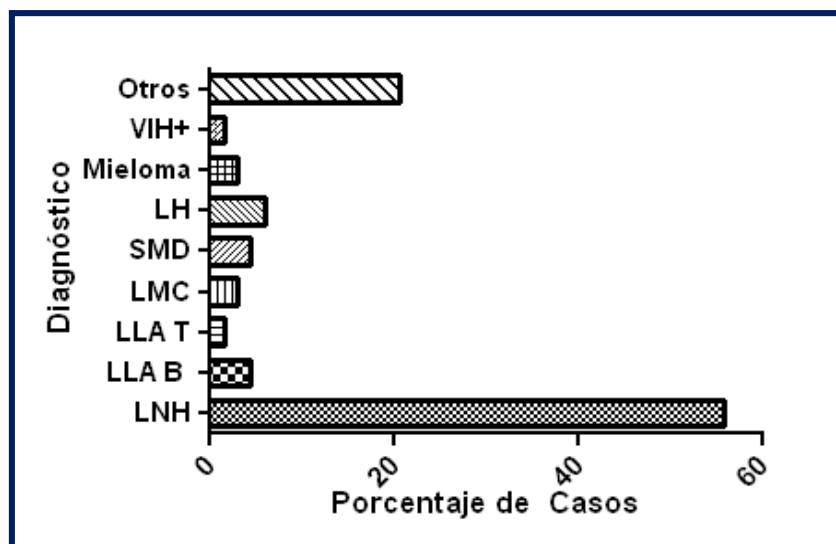


Figura 9. Tipos de patologías evaluadas en muestras de Líquido Pleural.

Después del análisis de los casos, se encontró que 31 (45.6%) estaban infiltrados por células tumorales y los 37 casos restantes (54.4%) fueron negativos para tumor.

En la tabla 5 se representan los valores absolutos de las distintas poblaciones celulares encontradas en las muestras con y sin infiltración tumoral.

Tabla 5. Números absolutos de poblaciones celulares detectados en muestras de líquido pleural sin y con infiltración tumoral.

Parámetros evaluados	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/ μ l	862	1.2 - 6166	1898	12 - 11981
Blastos/ μ l	-	-	576.5	0.1 - 3214
Linfocitos B patológicos/ μ l	-	-	1085	0.2 - 9788
Linfocitos T patológicos/ μ l	-	-	423	423
Células plasmáticas patológicas/ μ l	-	-	1.9	0.2 - 5.3
Células CD45 – patológicas/ μ l	-	-	336	0.2 - 671
Linfocitos T/ μ l	47.9	4.5 - 85	32.5	3.6 - 83.9
Monocitos/ μ l	85	0.04 - 421	216	0.53 - 2778
Neutrófilos/ μ l	246	0.06 - 2179	263	0.96 - 2932
Linfocitos B/ μ l	103.2	0.17 - 793	97.7	0.15 - 1580
Células NK/ μ l	38	0.1 - 393	19.3	1.54 - 46.8
Células dendríticas/ μ l	29	29	2.85	2.85
Macrófagos/ μ l	83.3	0.78 - 352	20.5	1.36 - 40.9

En relación a la calidad de las muestras de líquido pleural, se encontró que 11 muestras estaban contaminadas con sangre periférica (16.2%).

8.4 ANALISIS DE OTRAS MUESTRAS ESPECIALES

8.4.1 Líquido Peritoneal: Se analizaron 2 muestras de líquido peritoneal para el estudio de infiltración por mieloma múltiple en el momento del diagnóstico, encontrándose que una muestra era positiva para tumor. En los dos casos se detectaron linfocitos T, células NK y linfocitos B. El número promedio de células fue de 1562/ μ l con un rango de 71-3053 células/ μ l. La muestra que presentaba infiltración tumoral tenía 2811 células plasmáticas patológicas/ μ l que equivalían a 92% de la celularidad total. Una muestra estaba contaminada con sangre.

8.4.2 Líquido Sinovial: Se analizó 1 muestra de líquido sinovial para el estudio de infiltración por Síndrome Mielodisplásico en el momento del seguimiento. Esta muestra tenía 2.6 blastos/ μ l que equivalían a 7.6% de la celularidad total. Adicionalmente se detectaron linfocitos T, monocitos y linfocitos B. El número total de células fue de 34/ μ l. Esta muestra no estaba contaminada con sangre.

8.4.3 Líquido Pericárdico: Se analizó 1 muestra de líquido pericárdico para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin en el momento del diagnóstico. Esta muestra no estaba infiltrada por linfoma

y se detectaron linfocitos T, células NK, monocitos y neutrófilos. El número total de células fue de 131/ μ l. Esta muestra no estaba contaminada con sangre.

8.4.4 Líquido ascítico: Se analizaron 2 muestras de líquido ascítico, una para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin y la otra se recibió como meningoencefalitis. Las dos muestras se evaluaron en el momento del diagnóstico. Ninguna de las dos muestras tenía células patológicas y dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T, linfocitos B, células NK, células plasmáticas, monocitos y neutrófilos. El número total de células fue de 2062/ μ l con un rango de 1465-2959/ μ l. Una muestra estaba contaminada con sangre.

8.5 ESTUDIO DE BIOPSIAS

8.5.1 Biopsias de Ganglio linfático: Se analizaron 7 biopsias, para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin (n=3), Linfoma de Hodgkin (n=2), LLA-B (n=1) y LLA-T (n=1). Seis muestras se evaluaron en el momento del diagnóstico y 1 en el seguimiento de la enfermedad. Un caso de linfoma tenía células tumorales del 95% con recuento absoluto de 1078 células/ μ l y el caso de LLA-T tenía 88% de blastos con recuento absoluto de 2093 blastos/ μ l. Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T, linfocitos B policlonales y células plasmáticas. En 5 muestras se encontraron monocitos y neutrófilos. El número total de células aisladas de las biopsias fue de 2379/ μ l con un rango de 439-1493/ μ l.

8.5.2 Biopsias Abdominales: Se analizaron 2 biopsias, para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin B de célula grande (n=1) y para el estudio de Rabdomiosarcoma (n=1); las dos muestras se evaluaron en el momento del diagnóstico. El caso de linfoma tenía células tumorales del 79.6% con recuento absoluto de 5322 células/ μ l y el caso de Rabdomiosarcoma tenía 99.5% de células tumorales CD45 negativas con recuento absoluto de 21 células/ μ l. Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T y en el caso de linfoma, linfocitos B policlonales residuales. El número total de células aisladas de las biopsias fue de 3354/ μ l con un rango de 22-6687/ μ l.

8.5.3 Biopsias sin especificación de sitio anatómico de obtención de la muestra: Se analizaron 5 biopsias, para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin Linfoblástico T (n=1), Síndrome Mielodisplásico (n=1), Neuroblastoma (n=1), Síndrome Hemofagocítico (n=1) y plasmocitoma (n=1). Cuatro muestras se evaluaron en el momento del diagnóstico y una en el seguimiento de la enfermedad. El caso de linfoma tenía células tumorales del 98.4% con recuento absoluto de 105 células/ μ l, el caso de neuroblastoma tenía 95.9% de células tumorales CD45 negativas con recuento absoluto de 44 células/ μ l y el Síndrome Mielodisplásico tenía 2.6% de blastos con recuento absoluto de 1.8 células/ μ l. Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T (n=5), monocitos (n=4) y

Neutrófilos, linfocitos B y células NK (n=3). El número total de células aisladas de las biopsias fue de 107/ μ l con un rango de 46-35381/ μ l.

8.5.4 Biopsia de Médula ósea: Se analizó 1 biopsia para el estudio de infiltración por Leucemia Monocítica Aguda en el momento del diagnóstico. Se encontraron blastos del 21% con recuento absoluto de 211 células/ μ l, promonocitos tumorales del 35% (349 células/ μ l) y monocitos tumorales del 50% (151 células/ μ l). Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T, linfocitos B y células NK. El número total de células aisladas de la biopsia fue de 998/ μ l.

8.5.5 Biopsia de Testículo: Se analizó 1 biopsia para el estudio de infiltración por Leucemia Linfocítica Aguda B en el momento de la recaída. Se encontraron blastos del 99.4% con recuento absoluto de 2128 células/ μ l. Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T. El número total de células aisladas de la biopsia fue de 2141/ μ l.

8.5.6. Biopsia de Pulmón: Se analizó 1 biopsia para el estudio de infiltración por Linfoma No Hodgkin B de célula grande en el momento del seguimiento. No se encontraron células B patológicas. Dentro de la celularidad se encontraron linfocitos T y monocitos. El número total de células aisladas de la biopsia fue de 2.3/ μ l.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La mayoría de muestras especiales procesadas y analizadas en el servicio de Citometría de flujo del Hospital Universitario San Ignacio corresponden a Líquidos Ceforraquídeos de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda de células B, en distintos momentos clínicos de la enfermedad.
- En este trabajo se demuestra que la CMF es una herramienta de gran sensibilidad en el análisis de muestras especiales debido a que puede detectar cantidades mínimas de células tumorales y de células normales en diversos tejidos y en un amplio rango de enfermedades.
- Los resultados del presente trabajo demuestran que la comunidad médica y los pacientes se están beneficiando por la implementación del estudio de muestras especiales por Citometría en condiciones de calidad y con un recurso humano de calidad.
- El recurso humano responsable del procesamiento técnico y del análisis de este tipo de muestras debe tener las competencias académicas necesarias para garantizar la calidad de los resultados y debe promover en la comunidad médica el aseguramiento de la calidad en la fase pre-analítica de estas muestras con los neurólogos, oncólogos, hemato-oncólogos e infectólogos tratantes.
- El uso de estabilizantes debe ser implementado en la fase pre-analítica de los diversos servicios de Citometría de todo el país para garantizar la calidad de todos los resultados.
- Según el tipo de patología a evaluar cada servicio de Citometría debe tener establecidos los paneles inmunofenotípicos que se deben aplicar para responder la pregunta clínica. En los casos de diagnóstico y seguimiento se recomienda conocer el fenotipo en el momento del diagnóstico para diseñar el panel más adecuado para detectar con precisión la infiltración tumoral.
- Es importante seguir documentando este tipo de procedimientos y resultados ya que promueven la realización de una mejor Citometría de flujo en el país principalmente en grupos con menos experiencia que han emergido de forma importante en los últimos 5 años.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, López A, San Miguel J. **Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes.** *Cytometry A* 2004; 58:62–71.
2. Galatia D, Notob R, Vecchio L. **Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies.** *Leukemia Research* 2011; 37: 231-37.
3. Agriello E, Barcala V, Bergna M, Cismondi V, Ensínck A, Escalada A, Fiorenza G, et al. **Utilidad del Estudio de Citometría de Flujo en el Diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicos, Recomendaciones Generales del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF).** *Hematología* 2010; 3: 103-7.
4. Kraan J, Gratama J, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, Quijano S, et al. **Flow Cytometric Immunophenotyping of Fluid.** *Curr Protoc Cytom* 2008; Chapter 6: Unit 6.25.
5. Saavedra C, Quijano S, Romero M, Jaramillo R, Orduz R, Echeverri C, Londoño M, Orfao A. **Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de trastornos hematológicos.** *Biomedica* 2010; 30(Supl):11-21.
6. Quijano S, Lopez A, Manuel SJ, Panizo C, Deben G, Castilla C. **Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry.** *J. Clin Oncol* 2009; 27: 1462-69.
7. Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Rodríguez V, Campos AM, Infante EA, Cardozo C. **Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría.** *Universitas Scientiarum* 2010; 15:206-23.
8. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. **Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia.** *Semin Diagn Pathol* 2012; 29:2–11.
9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** 2008 Lyon, France: IARC Press; 4th Edition.
10. Craig FE, Foon KA. **Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.** *Blood* 2008; 111:3941–67.
11. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher 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; 26:1908–75.