

La citometría de flujo en el diagnóstico clínico

Alberto Orfao, Juana Ciudad, Antonio López,
María Consuelo López-Berges, Belén Vidriales,
Ana Macedo, Marcos González, Jesús F. San Miguel.
Servicio General de Citometría de la Universidad de Salamanca.

I.- Introducción

En su esencia la citometría de flujo representa un proceso en el que células u otras partículas biológicas incluidas en un flujo de líquido isotónico son empujadas a pasar, alineadas y de una en una, por delante de uno o varios detectores capaces de recoger y medir diferentes características físicas y/o químicas de esas células o partículas, a la vez que son iluminadas por un haz de luz, habitualmente un láser. En términos generales, las características celulares analizadas mediante esta tecnología son el reflejo de dos grandes grupos de parámetros: por un lado, los derivados de la luz que al incidir sobre la célula o partícula es dispersada y que se relacionan entre otras características con el tamaño y la granularidad celulares y, por otra parte los que se asocian con la luz generada como consecuencia de la presencia en la célula de fluorocromos, bien de forma natural (autofluorescencia) o unidos a ella artificialmente.

Desde su aparición, la citometría de flujo 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 anticuerpos monoclonales, la química de los fluo-

rocromos, los procedimientos de tinción citoquímica, la electrónica, la óptica y la tecnología láser. Todo ello unido a su progresiva utilización en el análisis automático y separación de células ha abierto nuevas perspectivas en el campo del diagnóstico clínico y la investigación biomédica. 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.

II.- Aplicaciones de la citometría de flujo

La utilidad de la citometría de flujo se fundamenta en que en relación con otras metodologías, aporta una gran sensibilidad, objetividad, rapidez y versatilidad analítica al estudio de la célula, 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, la detección y cuantificación de antígenos, el estudio del contenido protéico, 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^{++} y del pH, la separación física de células y cromosomas, entre otros. Por todo ello, en su desarrollo la citometría de flujo ha venido a proporcionar una información objetiva que complementa la obtenida con otras técnicas diagnósticas en áreas tan diferentes de la Medicina como la Inmunología, la Hematología, la Genética Médica, la Bioquímica Clínica, la Fisiología, la Anatomía Patológica, la Oncología, la Microbiología o la propia Medicina Interna.

A continuación revisaremos las aplicaciones más utilizadas de la citometría de flujo en el diagnóstico clínico como son la determinación de antígenos celulares y la cuantificación de ácidos nucleicos. No obstante, comentaremos también otras aplicaciones que aunque por el momento son experimentales, como el cariotipo de flujo, son prometedoras de cara a su utilización futura en este área de la Medicina.

1.- Detección y cuantificación de antígenos

La producción de un número cada vez mayor de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epitopos de antígenos presentes en células humanas ha impul-

sado enormemente la utilización de la citometría de flujo para la identificación y clasificación de células tanto normales como patológicas. Su empleo se basa en la identificación de antígenos mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. El empleo de fluorocromos que siendo excitados en longitudes de onda similares emiten en diferente zona del espectro luminoso, amplía a su vez el campo de aplicaciones de la citometría de flujo al poder combinar el uso en una misma muestra de diferentes anticuerpos monoclonales. El isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina y el PerCP son en la actualidad los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488nm (luz azul) si bien emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente. La pequeña superposición de los espectros de emisión se corrige mediante una compensación electrónica realizada en el citómetro, permitiendo su utilización simultánea.

En la actualidad, mediante esta metodología se han logrado importantes avances en el diagnóstico clínico, destacando la aportación de la citometría de flujo al estudio de las subpoblaciones linfocitarias y al diagnóstico y clasificación de las leucemias y linfomas. Así mismo, el empleo de esta tecnología ha demostrado ser de gran utilidad en otras áreas como la detección de autoanticuerpos e inmunocomplejos, el diagnóstico de trombocitopatías adquiridas, la realización del test cruzado linfocitario, el diagnóstico diferencial de neoplasias epiteliales, la detección tanto de oncoproteínas como de receptores celulares para factores de crecimiento y hormonas y la identificación de subpoblaciones celulares que representan únicamente una pequeña proporción de la celularidad global.

1-a.- Subpoblaciones linfocitarias:

La monitorización de las subpoblaciones linfocitarias tiene hoy especial relevancia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) debido por un lado a la expansión experimentada en la última década por el virus de la inmunodeficiencia humana y por otra parte a que la cuantificación en sangre periférica del número de células T CD4+ y de los linfocitos CD8+/CD38+ posee en estos pacientes gran valor diagnóstico y pronóstico. Estos factores han contribuido de forma decisiva a que la determinación de las poblaciones linfocitarias presente una técnica de rutina en muchos laboratorios. Así mismo, la utilidad de esta determinación ha quedado ampliamente demostrada en otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en la mo-

nitorización de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica o la enfermedad de Graves-Basedow, en el seguimiento de la recuperación inmune tras trasplante de médula ósea, en la identificación precoz del rechazo en individuos que han recibido un trasplante alogénico, o en la monitorización terapéutica de los pacientes con anemia aplásica.

En los últimos años la utilidad del estudio de las poblaciones linfocitarias se ha extendido a otros tipos de patología y así cada vez son más numerosos los trabajos en los que se hace referencia a su utilidad clínica en hemopatías malignas y en tumores sólidos. A modo de ejemplo merece destacar como en el mieloma múltiple se ha observado la existencia de un descenso de linfocitos CD4+ en sangre periférica asociado a un peor pronóstico. Estos pacientes presentan además un incremento de células natural-killer (NK), especialmente notorio en los estadios iniciales de la enfermedad cuyo significado biológico se desconoce por el momento, pero que podría reflejar un intento del sistema inmune de controlar el crecimiento tumoral.

Finalmente la utilidad de la determinación de las subpoblaciones linfocitarias en líquidos de lavados broncoalveolares con fines diagnósticos ha sido sugerida en la sarcoidosis donde se observa un predominio claro de células CD4+/CD29+/CD45RA- y en la neumonitis por hipersensibilidad, al existir en estos pacientes un notable incremento de los linfocitos T activados y de las células T CD8+/CD57+.

1-b.- Inmunofenotipaje de leucemias y linfomas:

Desde hace tiempo se conoce la utilidad del inmunofenotipo en la clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas así como de las crisis blásticas de los síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos con sus correspondientes implicaciones terapéuticas y pronósticas. En el caso de las leucemias mieloblásticas agudas, la importancia del inmunofenotipaje resulta evidente en el diagnóstico de las leucemias megacarioblásticas y de la variante microgranular de la leucemia promielocítica que morfológicamente pueden plantear problemas diagnósticos y en la clasificación de estas leucemias a través de la definición de la expresión de antígenos frente a las diferentes líneas mieloides y sus estadios madurativos. Así mismo, la reactividad para algunos antígenos -CD34, CD11b, CD7- se ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad.

El empleo de la citometría de flujo en el estudio de los síndromes linfoproliferativos crónicos posee especial relevancia al permitir un diagnóstico diferencial rápido entre una linfocitosis reactiva y un proceso monoclonal y en este caso contribuir a su filiación diagnóstica. En este sentido, el empleo del triple marcaje CD19/kappa/lambda es de gran utilidad en la detección de monoclonalidad B en sangre periférica, médula ósea, ganglio o bazo. Así mismo, la utilización de diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales permite diferenciar dentro de las linfocitosis crónicas de linfocitos grandes granulares los procesos de origen T CD3+/TCR+ de los de células NK CD3-/TCR-.

En la actualidad, merece destacar la utilidad de la citometría de flujo, en el análisis multidimensional de pequeñas poblaciones celulares enfocado fundamentalmente a la detección de enfermedad mínima residual en las leucemias agudas en remisión. Resultados preliminares indican que con el empleo de diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales y la citometría de flujo se puede investigar la presencia de enfermedad mínima residual en la gran mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda siendo el nivel de sensibilidad de la técnica de hasta 0.001% (una célula en 100.000). En estos casos, la comprobación de la persistencia de células con “fenotipos leucémicos” durante el tratamiento quimioterápico o su incremento tras la remisión completa, contribuyen de forma significativa al diagnóstico precoz de recaídas.

1-c.- Otras aplicaciones de la determinación de antígenos:

La utilización de las técnicas de inmunofluorescencia para la detección de inmunoglobulinas humanas mediante citometría de flujo ha abierto las puertas a la utilización de esta tecnología como método de rutina en el diagnóstico de diferentes enfermedades autoinmunes como la púrpura trombopénica idiopática, las anemias hemolíticas y las neutropenias autoinmunes. Por otra parte, su empleo para la realización del test cruzado linfocitario constituye en la actualidad el método de mayor sensibilidad y especificidad para demostrar, previamente a un trasplante, la presencia de anticuerpos preformados dirigidos frente a antígenos HLA de clase I y II, antígenos de células del endotelio vascular y del sistema monocítico.

La identificación mediante citometría de flujo de la ausencia de expresión en la membrana plaquetaria de reactividad para las glicoproteínas IIb/IIIa y Ib se viene utilizando desde hace algún tiempo para el diagnóstico de trombocitopatías congénitas como la enfermedad de Glanzman y el síndrome de Bernard-

Soulier, respectivamente. En este campo, la posibilidad de cuantificar el número de moléculas de un antígeno en la membrana plaquetaria y por lo tanto de conocer la densidad de expresión de una determinada glicoproteína, está revolucionando el estudio de la patología plaquetaria. Así, a modo de ejemplo, en la actualidad pueden cuantificarse diferentes glicoproteínas —CD62, CD63— y la conformación activada de otras —CD41a activado—, cuya expresión se ha relacionado con la activación plaquetaria.

El estudio de la expresión de moléculas de adhesión en la membrana citoplasmática constituye otro ejemplo de la utilidad de esta aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Así, la demostración del déficit selectivo de CD11a, de CD54 y CD11b, unidos a otros estudios funcionales son hoy de gran ayuda en el diagnóstico de pacientes afectados de inmunodeficiencias congénitas, hemoglobinuria paroxística nocturna y de la enfermedad de Chediak-Higashi, respectivamente.

El tipaje dirigido frente al antígeno HLA-B27, la cuantificación de receptores de progesterona/célula en los tumores de mama, el recuento de células "stem" en muestras de sangre periférica y de médula ósea obtenidas para posterior trasplante, la detección de la incorporación "in vivo" e "in vitro" de la bromodeoxiuridina y/o de la yododeoxiuridina en células para valorar la síntesis de ADN o la capacidad de recuperación de ADN dañado por diferentes agentes, representan otros ejemplos claros de la utilidad de la determinación de antígenos mediante citometría de flujo en el diagnóstico clínico.

2.- Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos mediante el empleo de diferentes compuestos químicos fluorescentes capaces de unirse de forma específica al ADN, al ARN o a ambos representa desde el punto de vista cronológico, una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo.

2-a.- Cuantificación de ADN:

En la actualidad existe un gran número de fluorocromos capaces de unirse al ADN celular. De ellos el yoduro de propidio y el bromuro de etidio son los de uso más extendido en citometría de flujo. Ambos se excitan a longitudes de onda de 488 (luz disponible en la mayoría de los citómetros de flujo) y se unen de forma estequiométrica al ADN de doble cadena. Su principal problema radi-

ca en que se unen también al ARN de doble cadena lo que hace aconsejable tratar previamente a las células con ARNasa. Además, para su tinción con estos fluorocromos la membrana de las células necesita haber sido fijada y/o permeabilizada, con lo que su utilización se limita a células que no vayan a ser separadas y cultivadas posteriormente.

En el caso del naranja de acridina no se presentan los problemas anteriores ya que este fluorocromo puede ser utilizado para teñir el ADN en células vivas y la fluorescencia debida a su unión a ácidos nucleicos de cadena simple –gran parte del ARN celular– se detecta en distinta zona del espectro luminoso –naranja– en relación con la debida a la unión con la mayoría del ADN celular –verde–. Sin embargo, este fluorocromo presenta el inconveniente de unirse al material plástico del citómetro de flujo creando problemas en mediciones posteriores.

Especial referencia merecen también el empleo entre otros del Hoechst y de la cromomicina-A3 que de forma específica se unen a pares de bases adenina/timina o citosina/guanina, respectivamente y de los análogos de la timidina como la bromodeoxiuridina o la yododeoxiuridina, incorporados de forma específica por las células que están sintetizando ADN.

En líneas generales la cuantificación de ADN proporciona dos tipos de información biológica distintos: por un lado nos orienta sobre la existencia o no de anomalías clonales de ADN –aneuploidias de ADN– y, por otra parte nos permite conocer la distribución de una población a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. La gran cantidad de estudios clínicos realizados hasta la fecha han puesto de manifiesto que además de proporcionar una información de gran valor sobre la biología de células normales y patológicas, la cuantificación del ADN celular mediante citometría de flujo posee gran impacto clínico en el área de la patología tumoral al contribuir al diagnóstico y a la valoración pronóstica de estos pacientes. Así, hoy se conoce que la presencia de aneuploidia de ADN constituye un factor pronóstico adverso en la gran mayoría de los tumores sólidos y hemopatías malignas, con excepción del neuroblastoma, el rabdomiosarcoma y la leucemia linfoblástica aguda del niño en los que su presencia se asocia a una mejor evolución de la enfermedad. De forma similar y pese a que el número de estudios realizados sea significativamente menor, la existencia de una elevada tasa proliferativa en tumores sólidos y en hemopatías malignas se asocia globalmente con una supervivencia más corta. No obstante, en ocasiones

se describe una mejor respuesta a la terapéutica antitumoral aunque asociada a una mayor tasa de recaídas. Son excepción importante en este caso los síndromes mielodisplásicos donde la existencia de una mayor proporción de células en fase S en la médula ósea se asocia con un mejor pronóstico.

El empleo combinado de la cuantificación de ADN y el marcaje para diferentes antígenos celulares abre nuevas perspectivas en este área. Así, la utilización de anticuerpos específicos de células tumorales o dirigidos frente a oncoproteínas y proteínas cuya expresión se relaciona con el ciclo celular, permite por un lado la identificación y cálculo selectivo del ciclo celular de la población neoplásica en muestras heterogéneas y, por otra parte, un estudio pormenorizado del ciclo celular.

2-b.- Cuantificación de ARN:

La cuantificación de ARN mediante citometría de flujo empleando diferentes fluorocromos como el naranja de tiazol, la tioflavina T o la pironina Y tiene especial relevancia en el diagnóstico clínico por su utilización como técnica de rutina para el recuento de reticulocitos, con el fin de conocer el equilibrio entre producción y destrucción de eritrocitos y en líneas generales la producción celular de la médula ósea. En relación con las técnicas clásicas, la citometría de flujo ofrece no sólo la posibilidad de realizar un recuento de reticulocitos de gran precisión (contaje de 10.000 células en pocos segundos) sino que además proporciona una información sobre el contenido relativo de ARN de cada reticulocito detectado lo que refleja en gran medida su estadio madurativo.

Pese a que esta sea la aplicación más extendida de la cuantificación de ARN en el diagnóstico clínico hay que recordar que la cuantificación simultánea de ADN y ARN mediante citometría de flujo proporciona también una información de gran utilidad para el conocimiento de la actividad metabólica celular que en ocasiones posee importante repercusión clínica. Así, estudios recientes han demostrado la utilidad de esta determinación en el estudio in vitro del efecto sinérgico de diferentes drogas antitumorales y factores de crecimiento celular.

3.- Otras aplicaciones de la citometría de flujo:

En la actualidad las aplicaciones experimentales de la citometría de flujo son muy diversas. De ellas hay algunas que presentan una clara utilidad clínica destacando el cariotipo de flujo, la separación de cromosomas y los estudios de hibridación in situ para secuencias específicas de ADN y/o ARN.

El cariotipo de flujo representa un complemento y a la vez una alternativa a los métodos clásicos de estudio de los cromosomas en metafase. Para ello los cromosomas son aislados a partir de preparaciones de metafases y teñidos con un fluorocromo –análisis unidimensional– o dos –estudio bidimensional–, empleándose habitualmente el yoduro de propidio o el bromuro de etidio y la combinación del Hoechst 33258 y la cromomicina-A3, respectivamente. Finalmente, los cromosomas en suspensión son analizados al pasar de uno en uno por delante de la fuente de luz del citómetro. En relación con otras técnicas, la citometría de flujo ofrece ciertas ventajas que hacen de ella una alternativa válida para la detección de anomalías cromosómicas. En este sentido, proporciona una elevada precisión analítica –en pocos minutos pueden analizarse más de 100.000 cromosomas– y una alta capacidad de resolución –permite distinguir diferencias en el contenido de ADN de un cromosoma superiores a 2 megabases–. Por ello, además de su potencial empleo en la identificación de anomalías cromosómicas compensadas de gran valor diagnóstico como la traslocación 9/22 de la leucemia mieloide crónica, su utilidad es manifiesta en el estudio de los polimorfismos individuales y de los “microcromosomas” humanos.

La separación de cromosomas permite purificar cromosomas de acuerdo a su intensidad de fluorescencia, es decir, a su contenido en ADN, adenina/timina y/o citosina/guananina según el fluorocromo empleado. Mediante esta tecnología pueden llegar a obtenerse cantidades del orden de microgramos de ADN de uno o varios cromosomas siendo la purificación conseguida superior a 90% . Esta metodología ha demostrado ser de gran utilidad tanto para el mapeo genético como para la producción de librerías de ADN recombinante.

La utilización conjunta de la hibridación in situ (HIS) por métodos fluorescentes y de la citometría de flujo se planteó desde el mismo momento en que surgieron las primeras técnicas no radiactivas de HIS. Desde el punto de vista práctico la citometría de flujo permite la cuantificación de forma rápida, precisa y simple de la intensidad de fluorescencia/célula correspondiente a sondas unidas a secuencias específicas de ADN y/o ARN, si bien no permite conocer su localización espacial. Así, estudios preliminares han demostrado su utilidad en la identificación de alteraciones cromosómicas numéricas mediante el empleo de sondas frente a secuencias de ADN de las regiones centroméricas de los cromosomas humanos. No obstante, por el momento esta metodología no permite la detección de translocaciones compensadas. Así mismo, su empleo es limita-

do en la identificación y cuantificación de pequeñas secuencias de ADN, debido fundamentalmente a problemas técnicos que siguen sin solucionarse como la eliminación de la autofluorescencia del núcleo.

REFERENCIAS

- Abrams C. S., Ellison N., Budzynski A. Z., Shattil S. J.: Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990; 75: 128-138.
- Albelda S. M., Buck C. A.: Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J.* 1990; 4: 2868-2880.
- Andreef M. (ed). *Clinical cytometry.* Ann N. Y. Acad Sci 468, 1986.
- Barlogie B., Stass S., Dixon D., Keating M., Cork A., Trujillo J. M., McCredie K. B., Freireich E. J. DNA aneuploidy in adult acute leukemia. *Cancer. Genet Cytogenet.*, 1987; 28: 213-228.
- Bigbee W. L., Branscomb E. W., Weintraub H. B., Papayannopoulou Th., Stamatoyannopoulos G. Cell sorter immunofluorescence detection of human erythrocytes labeled in suspension with antibodies specific for hemoglobin S and C. *J. Immunol. Meth.*, 1981; 45: 117-127.
- Braylan R. C., Benson W. A., Nourse V. A.: Cellular DNA of human neoplastic B-cells measured by flow cytometry. *Cancer. Res.* 1984; 44: 5010-5016.
- Campana D., Counstan-Smith E., Janossy G.: The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 1990; 76: 163-171.
- Carbajo S., Orfao A., Vicente-Villardón J. L., Carbajo-Pérez E.: Expression of silver-stained nucleolar organizer regions is coupled to cell cycle in rat thymic cells. *Cytometry* 1992; 13: (en prensa).
- Carbajo-Pérez E., Carbajo S., Orfao A., Vicente-Villardón J. L., Vázquez R.: Circadian variation in the distribution of cells throughout the different phases of the cell cycle in the anterior pituitary gland of adult male rats as analyzed by flow cytometry. *J. Endocrinol* 1991; 129: 329-333.
- Ciudad J., San Miguel J. F., González M., López-Berges M. C., Vidriales B., Orfao A.: Enfermedad mínima residual en LLA: análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo. *Sangre*, 1992 (en prensa).
- Coon J. S., Landay AL, Weinstein R. S. Advances in flow cytometry for diagnostic cytopathology. *Lab. Invest.*, 1987; 57: 453-479.
- Corash L., Rheinschmidt M. Detection of platelet antibodies with a fluorescence-activated flow cytometric technique. En "Manual of clinical

- laboratory immunology". Rose NR, Friedman H y Fahey SL (ed). American Society for Microbiology, Washington, 1986: 254-257.
- Cordero M., Bosch O., Pérez-Arellano J. L., Cañizo M. C., Orfao A., González-Díaz M.: Defective T-cell colony growth in intravenous drug addicts is not related to HIV infection. *Eur. J. Intern. Med.* 1991; 2: 187-191.
- Danova M., Riccardi A., Mazzini G: Cell cycle-related proteins and flow cytometry. *Haematologica* 1990; 75: 252-264.
- Darzynkiewicz Z. y Crissman H. A. (ed). *Flow cytometry*. Academic Press, London, 1991.
- Duque R. E., Everett E. T., Iturraspe J.: Flow cytometric analysis of acute leukemias. *Clin. Immunol. Newsl.* 1990; 10: 43-50.
- Foon K. A., Todd III R. F.: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1986; 68: 1-31.
- Giorgi J. V., Hultin L. E.: Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin. Immunol. Newsl.* 1990; 10: 55-61.
- Gómez E., San Miguel J. F., González M., Orfao A., Cañizo M. C., Moraleda J. M., López Borrasca A. The value of the immunological subtypes and individual markers compared to classical parameters in the prognosis of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol.*, 1991; 9: 33-42.
- Gómez Alonso A., García García J., Orfao de Matos A.: El análisis de ADN mediante citometría de flujo en la patología colorectal maligna. *Cir. Esp.* 1991; 50: 132-137.
- González M., San Miguel J. F., Gascon A., Moro M. J., Hernandez J. M., Ortega F., Jimenez R., Guerras L., Romero M., Casanova F., Sanz M. A., Portero JA, Orfao A. Increased expression of natural-killer-associated and activation antigens in multiple myeloma. *Am. J. Hematol*, 1992; 39: 84-89..
- Gray J. (ed). *Flow cytogenetics*. Academic. Press, London, 1990.
- Hall P. A., Levison D. A., Wright N. A. (eds). *Assessment of cell proliferation in clinical practice*. Springer-Verlag, London, 1992.
- Hedley D. W.: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 1989; 10: 229-241.

- Hernández J. M., González-Sarmiento R., Martín C., González M., Sánchez I., Corral J., Orfao A., Cañizo M. C., San Miguel J. F., López Borrasca A. Immunophenotypic, genomic and clinical characteristics of blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Hematol.*, 1991; 79: 408-414.
- Keren D. F. (ed). *Flow cytometry in clinical diagnosis*. ASCP Press. Chicago, 1989.
- Kerman R. H., VanBuren C. T., Lewis R. M., DeVera V., Baghdasarian V., Gerolami K., Kahan B. D.: Improved graft survival for flow cytometry and anti-human globulin crossmatch-negative retransplant recipients. *Transplantation* 1990; 49: 52-56.
- Laerum O. D. y Bjerknes R. (ed). *Flow cytometry in Hematology*. Academic Press, London, 1992.
- Landay A. L., Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV: Applications of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990; 4: 479-497.
- Loken M. R., Brosnan J. M., Bach B. A., Ault K. A. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*, 1990; 11: 453-459.
- Look A. T., Roberosn P. K., Williams D. L. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1985; 65: 1079-1086.
- López-Mediavilla C., Orfao A., San Miguel J. F., Medina J. M.: Developmental Changes in rat liver mitochondrial populations analyzed by flow cytometry. *Exp. Cell. Res.* 1992; 203 (en prensa).
- Lum L. G.: The kinetics of immune reconstitution after human bone marrow transplantation. *Blood* 1987; 69: 369-380.
- Melamed M. R., Lindmo T., Mendelshon M. L. (ed). *Flow cytometry and sorting*. Wiley-Liss, New York, 1990.
- Merkel D. E., Dressler L. G., McGuire W. L. Flow cytometric cellular DNA content and prognosis in human malignancy. *J. Clin. Oncol.*, 1987; 5: 1690-1703.
- Nicholson J. K. A.: Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989; 113: 598-605.

- Orfao A., Ciudad JI, González M., San Miguel J. F., López-Berges M. C., García A. R., Ramos F., del Cañizo M. C., Ríos A., Sanz M., López Borrasca A. Prognostic value of S-phase WBC count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1992; 6: 47-51.
- Orfao A., González M., Ciudad J, López-Berges M. C., López A., San Miguel J. F., López Borrasca A.: Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico. *Biol. Clin. Hematol.* 1992 (en prensa).
- Orfao A, Ruiz-Argüelles A. Citometría de flujo y su aplicación en hematología. En: "Enciclopedia de Hematología Iberoamericana". López Borrasca A., Arocha Pirango C. L., Campos Guerra C., Parreira A., Pavlovsky S., Ruiz-Argüelles G. y San Miguel J. F. (ed), Universidad de Salamanca, 1992 (en prensa).
- Orfao A., Vidriales B., González M, López-Berges M. C., Cañizo M. C., San Miguel J. F. Diagnostic and prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myeloid leukemia. En: "Recent Results in Cancer Research. Recent advances in tumor cell biology of acute leukemias: impact on clinical diagnosis and therapy". Ludwig W. D. y Thiel E (ed). Springer-Verlag, Berlin 1992 (en prensa).
- Quirke P, Dyson J. E. D.: Flow cytometry: methodology and applications in Pathology. *J. Pathol.* 1986; 149: 79-87.
- Rebulla P., Morelati F., Greppi N., Villa A., Barazzetta M. T., Crespiatico L., Parravicini A., Zanella A.. Red cell antibodies and flow cytometry: in vivo evaluation of red blood cell compatibility with a flow cytometry antiglobulin test. En: "Advances in Cytometry: II. Cytometry and monoclonal antibodies: research and clinical applications". Vitale M, Papa S. y Pessano. S (ed). Edi. Ermes, Milan, 1990: 335-342.
- Rose N. R., Macario E. C., Fahey J. L., Freidman H., Penn G. M. (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Amer Soc for Microbiol. Washington, C.D., 1992.
- San Miguel J. F., Fisac P., González M., Calmuntia M. J., Hernández J., Bascones C. Immunological phenotype of the microgranular variant of acute promyelocytic leukaemia. *Haematologia*, 1986; 20: 49-50.
- San Miguel J. F., González M., Cañizo M. C., Ojeda E., Orfao A. Caballero M. D., Moro M. J., Fisac P., López Borrasca A. Leukemias with megakaryoblastic

- involvement: clinical, hematological and immunological characteristics. *Blood*, 1988; 72: 402-407.
- San Miguel J. F., González M., Gascon A., Moro M. J., Hernandez J. M., Ortega F., Jiménez R., Guerras L., Romero M., Casanova F., Sanz M. A., Sanchez J., Portero J. A., Orfao A. Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. *Br. J. Hematol.*, 1992; 80: 305-309.
- San Miguel J. F., González M., Orfao A., López Borrascas A. *Inmunopatología de leucemias y linfomas*. MTA Medicina Interna, 1988; 6: 9-47.
- San Miguel J. F., Hernández J. M., González-Sarmiento R., González M., Sánchez I., Orfao A., Cañizo M. C., López Borrascas A. Acute leukemia following a primary myelodysplastic syndrome: immunophenotype, genotype and clinical characteristics. *Blood*, 1991; 78: 768-774.
- Shapiro H. M. (ed). *Practical flow cytometry*. Alan R. Liss Inc, New York, 1988.
- Sobol R. E., Mick R., Royston I., Davey F. R., Ellison R. R., Newman R., Cuttner J., Griffin J. D., Collins H., Nelson D. A., Bloomfield C. D. Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *N. Eng. J. Med.*, 1987; 316: 1111-1117.
- Terstappen L. W. M. M., Huang S., Safford M., Lansdorp P. M., Loken M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*, 1991; 77: 1218-1227.
- Terstappen L. W. M. M., Könemann S., Safford M., Loken M. R., Zuvlutter K., Büchner Th., Hiddemann W., Wörmann B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. *Leukemia*, 1991; 5: 315-321.
- Terstappen L. W. M. M., Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry*, 1988; 9: 548-556.
- Terstappen L., Loken M. R. Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multidimensional flow cytometry. *Anal. Cell. Pathol.*, 1990; 2: 229-240.
- Totterman T. H., Hanas R., Bergstrom R., Larsson E., Tufvesen G.: Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft

- infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. *Transplantation* 1989; 47: 817-823.
- Tschoepe D., Spangenberg P., Esser J., Schwippert B., Kehrel B., Roesen P. Gries F. A. Flow cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry*, 1990; 11: 652-656.
- Vindelov L. L., Christensen I. B. J., Jensen G., Nissen N. I.: Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. *Cytometry* 1983; 3: 332-338.
- Yen A. (ed). *Flow cytometry advanced research and clinical applications*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1989.
- Zocchi M. R., Marelli F., Poggi A. Simultaneous cytofluorometric analysis for the expression of cytoplasmic antigens and DNA content in CD3- human thymocytes. *Cytometry*, 1990; 11: 883-887.