



**Evaluación del efecto del estabilizante celular TransFix™ en la morfología,
la viabilidad celular y el inmunofenotipo de subpoblaciones celulares de
médula ósea humana**

Lina Marcela Beltrán Serna

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de Bacteriología
Bogotá DC.
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 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 vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente quiero agradecer a la Dra. Sandra Quijano por darme la oportunidad y la confianza de realizar mi trabajo de grado bajo su dirección, y brindarme el tiempo y los conocimientos necesarios para llevar a cabo mi trabajo.

Al Laboratorio Clínico y en especial al Servicio de Citometría del Hospital Universitario San Ignacio por sus recursos y aportes brindados en los últimos 3 meses y a la Dra. Claudia Cardozo, Coordinadora del Laboratorio Clínico por aprobar la realización de este trabajo y brindar los recursos materiales necesarios para culminar con éxito mi trabajo. A la sección de Hematología, en especial a la Dra. Chelita por el tiempo y colaboración brindados para el desarrollo de parte de este trabajo.

A la Pontificia Universidad Javeriana y a mis padres por darme la oportunidad de estudiar en una de las mejores universidades de Colombia.

DEDICATORIA

Detrás de cada sueño, siempre hay personas que nos apoyan y creen en nosotros, por eso al término de esta etapa de mi vida, quiero dedicar este trabajo a mis padres Noé y Cecilia, quienes me han apoyado y me han brindado todos los valores y recursos necesarios a lo largo de mi vida para cumplir mis metas, hoy la culminación de otra etapa de mi vida, mi carrera profesional. Solo quiero que sepan que mis triunfos e ideales son inspirados en ustedes y que los quiero con todo mi corazón.

A mi hermano John por su cariño, apoyo y motivación para la culminación de mi carrera profesional.

A mi novio Puppo, por la comprensión, amor y alegría que le ha dado a mi vida.

A todos mis familiares, porque directa o indirectamente me han apoyado y han estado pendientes de esta etapa de mi vida.

A mis profesores por sus enseñanzas y por inculcarnos a ser cada día los mejores en lo que hacemos.

A mis compañeros de universidad por todos los buenos y malos momentos que compartimos, siempre llenos de aprendizajes, risas y experiencias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
Resumen	12
1. Introducción	13
2. Justificación y planteamiento del problema	16
3. Marco teórico	18
3.1 La médula ósea	18
3.2 La citometría de flujo y su utilidad clínica	18
3.3 TransFix™: estabilizante comercial utilizado en CFM y sus efectos en las características celulares	20
4. Objetivos	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. Metodología	25
5.1 Recolección de muestras de médula ósea	25
5.2 Análisis inmunofenotípico mediante CFM	25
5.3 Análisis de la morfología celular de las muestras de médula ósea	29
5.4 Análisis de resultados	29
6. Resultados	32
6.1 Análisis de viabilidad celular con 7-AAD	32
6.2 Análisis de los recuentos absolutos totales en muestras de MO	32
6.3 Recuentos celulares relativos de subpoblaciones celulares en MO	33
6.4 Análisis de los parámetros de dispersión: FSC (tamaño)	34
6.5 Análisis de los parámetros de dispersión: SSC (complejidad interna)	36

6.6 Evaluación de los CMF de diferentes marcadores celulares en muestras de M.O	39
6.7 Análisis de la morfología celular de muestras de MO	42
7. Discusión	46
8. Recomendaciones y conclusiones	51
9. Bibliografía	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de subpoblaciones celulares de linaje mieloide en MO normales en combinaciones de 6 fluorescencias diferentes.	27
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de subpoblaciones celulares de linaje linfoide en MO normales en combinaciones de 6 fluorescencias diferentes.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ejemplo representativo del análisis por CFM de selección de células en singletes y esferas en una muestra de MO para estimar el recuento absoluto (células/ul) presentes en cada tubo.	31
Figura 2. Ejemplo de la selección (<i>gate</i>) de células CD34+.	31
Figura 3. Porcentajes de células vivas en muestras teñidas con 7-AAD estabilizadas o no con TransFix™ y almacenadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y temperaturas (4°C y temperatura ambiente).	32
Figura 4. Valores absolutos totales de muestras con y sin estabilizante celular TransFix™ almacenadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y temperaturas (4°C y ambiente).	33
Figura 5. Recuentos celulares relativos de los linajes granulocítico (LG), monocítico (LM), linfoide (LL), eritroide (LE) y de células CD34+ de origen mieloide y linfoide a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular comparadas con las muestras basales.	35
Figura 6. Análisis del FSC de 6 diferentes linajes celulares de MO a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular, comparadas con las muestras basales.	37
Figura 7. Análisis del SSC de 6 diferentes linajes celulares de MO a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular comparadas con las muestras basales.	38
Figura 8. Evaluación del canal medio de fluorescencia de CD45 en 5 diferentes linajes celulares de MO a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular comparadas con las muestras basales.	40

Figura 9. Evaluación del canal medio de fluorescencia de 8 antígenos de membrana en 6 diferentes linajes celulares de MO a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular comparadas con las muestras basales.	41
Figura 10. Morfología celular de la MO basal.	43
Figura 11. Morfología celular de muestras de MO sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 24 horas.	43
Figura 12. Morfología celular de muestras de MO sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 48 horas.	44
Figura 13. Morfología celular de muestras de MO sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 72 horas.	44
Figura 14. Principales alteraciones en el linaje granulocítico.	45

RESUMEN

Introducción: El estabilizante celular TransFix™ ha sido utilizado en los últimos 10 años por los servicios de citometría de flujo en muestras de sangre periférica (SP) y líquido cefalorraquídeo (LCR) por su alta capacidad de mantenimiento de diversos parámetros celulares como la expresión de algunos antígenos de membrana, la dispersión celular (tamaño y complejidad interna), los recuentos celulares, la integridad y viabilidad celular hasta por 10 días (1-5). Actualmente no se conocen sus efectos en muestras de médula ósea (M.O).

Objetivo: Evaluar el efecto del estabilizante TransFix™ en diferentes subpoblaciones celulares de médula ósea humana.

Metodología: Cinco muestras de M.O normal fueron almacenadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y temperaturas (temperatura ambiente y 4°C) con y sin estabilizante TransFix™ para realizar análisis por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) y de morfología por microscopía convencional. En los análisis por CFM se evaluó la viabilidad celular con el colorante de viabilidad 7-AAD, tamaño y complejidad interna (FSC y SSC), canales medios de fluorescencia para marcadores asociados a diferenciación mieloide y linfoide y recuentos celulares absolutos y relativos. La evaluación morfológica se realizó teniendo en cuenta la conservación o los cambios en las características tanto nucleares como citoplasmáticas.

Resultados: Las muestras estabilizadas con TransFix™ conservan mejor la viabilidad celular y los recuentos celulares absolutos y relativos respecto a las muestras sin estabilizante. En cuanto a los parámetros de dispersión se evidencia una disminución significativa del FSC y SSC en la línea granulocítica; mientras que en los demás linajes estos parámetros se encuentran aumentados en comparación con las muestras en condición basal y las muestras no estabilizadas. Respecto a los canales medios de fluorescencia (CMF) de los marcadores analizados se observa tanto en las muestras con TransFix™ como en las no estabilizadas disminución de los niveles de expresión de CD45, CD10, CD11b, CD19, y CD20, siendo estos CMF significativamente más bajos en las muestras estabilizadas. Por otra parte los

CMF de las moléculas CD34, CD13 y CD38 se mantienen durante el tiempo y las diferentes condiciones de temperatura. Finalmente el análisis morfológico evidencia que a partir de las 24 horas las muestras con y sin estabilizante empiezan a presentar alteraciones celulares.

Conclusiones: El tratamiento que mejor preserva las muestras de M.O para análisis por CFM en cuanto a viabilidad celular y recuentos celulares es TransFix™ con resultados más óptimos a temperatura ambiente y por un periodo de almacenamiento de hasta 48 horas. Contrario a lo descrito en otros estudios en muestras de SP estabilizadas con TransFix™, en nuestro trabajo observamos alteraciones importantes en la expresión de diferentes antígenos celulares. Para el análisis morfológico, el extendido debe realizarse en un periodo máximo de 24 horas después de obtenida la muestra, no es recomendable el uso del estabilizante celular TransFix™ para evaluar este parámetro.

1. INTRODUCCIÓN

El análisis inmunofenotípico de la M.O por CFM se realiza de forma rutinaria para la identificación y la caracterización de subpoblaciones leucocitarias cuando existen sospechas de hematopoyesis anormal. Esto se hace posible por medio de combinaciones de paneles de anticuerpos monoclonales donde se ha confirmado una amplia heterogeneidad de cambios inmunofenotípicos en diferentes subpoblaciones celulares incluyendo los precursores hematopoyéticos y células más diferenciadas, demostrando así que los cambios morfológicos coexisten con las modificaciones de la expresión de antígenos asociados a diferenciación celular (6, 7). Además, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta fundamental y de gran importancia a nivel clínico, en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedades onco-hematológicas (8).

Una de las variables que afecta de forma importante la calidad de la muestra para estudios de citometría, es el tiempo que transcurre entre su obtención y procesamiento, pues se recomienda analizarla en el menor tiempo posible con el fin de preservar el mayor número de células y de ésta forma lograr una mayor sensibilidad (8). Teniendo en cuenta las condiciones socio-económicas y geográficas de la mayoría de los laboratorios clínicos en Latinoamérica, existe un impacto negativo sobre la calidad de la muestra, puesto que diferentes laboratorios y hospitales deben remitir muestras a instituciones que cuenten con el servicio de citometría y generalmente existe una amplia distancia entre el sitio geográfico donde se toma la muestra y el laboratorio, afectando de ésta forma la viabilidad celular, los recuentos celulares absolutos y relativos y la expresión de los antígenos de membrana (9, 10). Para lograr preservar las células de diferentes muestras como M.O, SP, líquidos corporales, etc. se requiere el uso de estabilizantes estandarizados con el fin de conservar características celulares y brindar resultados que reflejen la condición clínica real del paciente y contribuyan a un diagnóstico acertado.

Actualmente TransFix™ es el estabilizante celular más utilizado para preservar muestras biológicas hasta por un periodo comprendido entre 7-10 días post-obtención de la muestra. En diferentes estudios reportados en la literatura sobre su implementación, principalmente en muestras de sangre periférica para recuentos de subpoblaciones linfocitarias, se ha evidenciado que la expresión de una variedad de marcadores inmunofenotípicos se conserva en estas subpoblaciones celulares, al igual que la viabilidad celular y otros parámetros celulares (1-4). En la actualidad no existen reportes que documenten el efecto del estabilizante TransFix™ en subpoblaciones celulares de M.O.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente estudio evaluamos los efectos del estabilizante TransFix™ en la morfología y mediante citometría de flujo la viabilidad, recuentos celulares e inmunofenotipo de diferentes subpoblaciones celulares de la M.O humana almacenada a temperatura ambiente y a 4 grados centígrados (4°C) por un periodo de tres días en comparación con muestras no estabilizadas, lo cual tendrá repercusión a nivel clínico en los servicios de citometría que analicen en su rutina muestras biológicas, especialmente M.O.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La CFM representa una herramienta de gran importancia a nivel clínico, fundamental para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con diversos tipos de enfermedades tanto hematológicas como no hematológicas. Esta herramienta cuenta con varias ventajas como rapidez, sensibilidad, especificidad, objetividad y utilidad, debido a que se pueden estudiar diversos tipos de muestras biológicas, incluyendo M.O, SP, aféresis, cordón umbilical, biopsias de tejido, líquidos corporales, entre otras (7, 8, 11). Algunos aspectos de gran relevancia en la fase pre-analítica de los estudios por CFM, son el tipo y la calidad de la muestra que se relacionan con la celularidad, la viabilidad, el volumen, la integridad y expresión de marcadores de membrana e intracelulares, y el tiempo entre su obtención, transporte y procesamiento hasta el laboratorio. Muestras biológicas como líquidos corporales y SP requieren del uso de estabilizantes para preservar las características de las células por periodos de tiempo prolongados, con el fin de no reportar resultados falsos negativos por pérdida de viabilidad celular. TransFix™ es uno de los estabilizantes de uso comercial más difundidos en la actualidad y estudios han reportado que el tratamiento de SP y LCR con TransFix™ mantiene la integridad y la viabilidad celular en periodos de tiempo de hasta 7-10 días, con conservación de marcadores inmunofenotípicos de superficie celular (1-5). Sin embargo, a la fecha no hay estudios que reporten el uso de este estabilizante en muestras de M.O, teniendo en cuenta que la M.O es el tejido idóneo para realizar diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas y síndromes mielodisplásicos y que no todas las instituciones hospitalarias cuentan con la CFM o el personal entrenado para el estudio de las muestras de sus pacientes, por lo que es necesario remitir las muestras de M.O a laboratorios distantes, lo cual afecta la preservación y calidad (recuentos absolutos y relativos, marcadores de membrana e intracelulares, morfología y viabilidad) de las mismas.

Considerando que no existen estudios que demuestren la preservación celular en muestras de M.O, es necesario hacer un estudio en el que se evalúen

distintos parámetros celulares en M.O estabilizada con TransFix™ y sin estabilizar bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura, evaluando la morfología, obteniendo recuentos celulares absolutos y relativos, midiendo viabilidad celular y canales medios de fluorescencia con el fin de conocer el tratamiento óptimo de preservación celular, documentar las recomendaciones técnicas para que pueda ser implementado en la rutina de los servicios de CFM y estandarizar un protocolo para la preservación de las muestras de M.O.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 La médula ósea

La M.O está compuesta por tejido conjuntivo reticular el cual le ofrece un microambiente hematopoyético que regula la proliferación, supervivencia, autorrenovación y migración de las células hematopoyéticas. La maduración y la diferenciación celular pueden ser monitoreadas por cambios en la citomorfología y el inmunofenotipo los cuales se pueden analizar mediante la CFM (12, 13).

El estudio de la M.O por CFM se realiza de forma rutinaria para la identificación y la caracterización de subpoblaciones leucocitarias y otros linajes celulares cuando existen sospechas de hematopoyesis anormal. Esta identificación y caracterización se hace posible gracias a la introducción de una amplia gama de anticuerpos monoclonales estandarizados para el estudio de médula ósea normal, donde se ha confirmado una amplia heterogeneidad inmunofenotípica en los precursores hematopoyéticos y en subpoblaciones celulares más diferenciadas, demostrando en distintos trabajos que los cambios morfológicos coexisten con las modificaciones de la expresión de antígenos asociados a diferenciación celular. Actualmente se conocen con exactitud los cambios fenotípicos que tienen lugar durante la diferenciación de las distintas series hematopoyéticas, cambios de gran relevancia para la interpretación de fenotipos asociados a leucemias (3, 7, 14). La hematopoyesis anormal puede ser el resultado de un arresto durante la diferenciación de los precursores de las células B, regeneración de la médula ósea luego de una terapia inmunosupresora o como respuesta a una infección, displasia en uno o más linajes mieloides, aumento de las células hematopoyéticas causado por una depleción periférica o una expansión no regulada de células hematopoyéticas neoplásicas (3).

3.2 La citometría de flujo y su utilidad clínica

La CFM es una herramienta que cuenta con diversas ventajas como rapidez, sensibilidad, especificidad y objetividad, la cual es actualmente de gran utilidad en el diagnóstico, pronóstico, confirmación y seguimiento de enfermedades

hematológicas como leucemias, linfomas, síndromes mieloproliferativos, mieloma múltiple, policitemia vera y anemias; no hematológicas como infecciones (VIH, EPOC, asma, alveolitis, etc.) y neoplasias (7, 8,11). Una de las ventajas más relevantes de la CFM es la elevada sensibilidad ya que permite identificar y caracterizar células neoplásicas entre células normales en SP, MO y LCR aun cuando estas células se encuentren en muy bajas frecuencias (15). Para que el resultado del análisis de la muestra pueda ser validado y se de garantía acerca de éste, el servicio o unidad de citometría de cada hospital debe contar con personal entrenado que procese las muestras según los protocolos establecidos por cada unidad y tenga en cuenta los criterios y algoritmos diagnósticos sugeridos por grupos consenso (8,16); así mismo, siempre y cuando sea posible, los resultados brindados por la CFM, deben correlacionarse con los resultados de los análisis morfológicos y moleculares los cuales permitirán realizar un diagnóstico clínico acertado (17). Para poder emitir resultados confiables, es importante tener una muestra adecuada donde se garantice la calidad de la misma. Para poder preservar la calidad, los citometristas han propuesto protocolos donde según el tipo de muestra recomiendan el uso o no de anticoagulantes, lavados y centrifugación, tiempos máximos de obtención de muestras y su procesamiento, el uso de soluciones de transporte y estabilizantes debido a que en varias ocasiones las muestras son trasladadas entre hospitales y/o centros de referencia o debido a que en algunos tipos de muestras biológicas la viabilidad y concentración celular son muy bajas. Para el análisis por CFM de la muestra de interés (M.O), en el primero consenso Colombiano de citometría de flujo publicado en el 2010 se reportaron las recomendaciones técnicas más relevantes para el análisis de M.O dentro de las que se incluyen tomar la muestra en tubo con EDTA o heparina, analizarla en un plazo no mayor a 24 horas, realizar los lavados y centrifugaciones de acuerdo a los protocolos establecidos, no utilizar soluciones de transporte ni estabilizantes (excepto líquidos biológicos) ya que no existen reportes en la literatura que documenten su uso en la rutina clínica (8).

3.3 TransFix™: estabilizante comercial utilizado en CFM y sus efectos en las características celulares

En la fase pre-analítica de los estudios por citometría se han implementado sustancias estabilizantes comerciales que tienen la propiedad de preservar las características celulares en muestras biológicas (2, 4, 18, 19). Un grupo de científicos del UK NEQAS (Programa Nacional del Reino Unido para la evaluación externa de la calidad) desarrolló un estabilizante celular llamado comercialmente TransFix™, útil en muestras de LCR, MO y SP, el cual proporciona ventajas como tiempos de mantenimiento de las muestras entre 24 horas-10 días, almacenamiento y transporte a diferentes temperaturas (20-25°C y 4°C), y conservación de propiedades celulares como viabilidad, inmunofenotipo, recuentos absolutos y relativos y morfología; todas éstas variables se correlacionan de forma significativa con el estado clínico real del paciente (1, 3-5, 18). Aunque los fabricantes de este estabilizante en las indicaciones del uso del mismo mencionan muestras de M.O, al revisar la literatura no existe documentación sobre el efecto del TransFix™ en este tipo de muestra biológica.

La mayor utilidad actual del estabilizante TransFix™ reportada en la literatura es la conservación de muestras de SP de pacientes VIH+ para evaluar los recuentos de linfocitos T CD4+ y CD8+ (LT CD4+ y CD8+) por CFM con el fin de conocer el estado del sistema inmunológico del paciente y realizar el seguimiento al tratamiento (2, 19). Varios estudios han evaluado diferentes parámetros celulares teniendo en cuenta las variables tiempo y temperatura. En cuanto a los recuentos absolutos celulares se encuentra reportado un estudio en muestras de SP donde las muestras fueron almacenadas por un periodo de 10 días a 4°C con y sin TransFix™ en una dilución 1/10, se evaluaron 3 subpoblaciones: linfocitos, monocitos y granulocitos, donde los recuentos absolutos de las 3 subpoblaciones fueron altos en las muestras estabilizadas respecto a las muestras sin tratar, mostrando diferencias significativas al día 10, a su vez se observa que la subpoblación mas sensible a la muerte celular son los granulocitos (15). En cuanto a los recuentos relativos celulares en muestras de SP se evaluó el recuento de LT CD4+ en muestras

sin estabilizante y con estabilizante en diluciones 1/5 y 1/10, durante 10 días a 3 diferentes temperaturas (25°C, 37°C y 42°C). Las muestras incubadas a 25°C y 37°C muestran un alto porcentaje de recuperación celular (>80%) hasta por 10 días. Por el contrario las muestras sin estabilizante, muestran una disminución significativa del porcentaje celular ya que se van perdiendo de forma gradual con el tiempo. Respecto a las muestras incubadas a 42°C se evidencia un bajo porcentaje de recuperación celular, siendo 66.6% el más alto al día 3 cuando la muestra fue estabilizada con TransFix™ en una dilución 1/5 (4). Esto pone en evidencia que el estabilizante celular TransFix™ tanto en dilución 1/5 como 1/10 tiene una alta tasa de recuperación celular (>80%) por largos periodos de tiempo (hasta 10 días) cuando las muestras se almacenan a temperaturas de 4°C, 25°C y 37°C. En muestras de LCR se recomienda reducir al máximo la manipulación de la muestra con el fin de preservar el mayor número de células posibles, pues se ha visto que los análisis por CFM, pasada una hora después de la recolección de la muestra, causa degeneración celular por lo que disminuye el recuento celular, de no poder analizarse dentro de éste tiempo, las muestras se deben preservar con estabilizantes previniendo así la pérdida celular por lo efectos citotóxicos “*in vitro*” del LCR sobre los leucocitos (20, 21). Estudios muestran, que incluso con bajos volúmenes de muestra que contienen pocas células, la CFM es útil en la caracterización de subpoblaciones presentes en estas muestras, pues se demuestran resultados confiables con volúmenes desde 0.6 ml (21,22). Debido a lo anterior expuesto, se recomienda estabilizar la muestra, pues se ha visto que cuando se realiza una dilución 1/10 con TransFix™ y se almacena a 4°C evita la muerte celular y conserva características similares a la muestra fresca por un tiempo de hasta 72 horas (23).

Otro parámetro evaluado en estos reportes es la viabilidad celular, donde se han utilizado colorantes fluorescentes como 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), anexina V (AnxV) y yoduro de propidio (IP), en éstos estudios se ha evidenciado un aumento en el número de células muertas con el paso de los días en muestras tanto estabilizadas como no estabilizadas de sangre total (ST) y separadas por gradientes de densidad (evaluando únicamente linfocitos

y monocitos), almacenadas a 4°C por un periodo de 15 días (24). Otro estudio donde solo se evaluó la tinción con IP en granulocitos y linfocitos almacenados a 4°C por un periodo de 10 días, evidenció que los granulocitos estabilizados con TransFix™ tienen un porcentaje más alto de células positivas para IP respecto a las muestras sin estabilizar, siendo éstos la subpoblación más susceptible a la muerte celular contrario a los linfocitos, quienes son más resistentes a ésta y no evidenciaron cambios significativos entre las muestras con y sin estabilizante (15).

Además, se han evaluado los parámetros de dispersión FSC y SSC en muestras de SP con y sin TransFix™. Los granulocitos y monocitos estabilizados empiezan a generar alteraciones en la dispersión de la luz 1-2 días y 4 días respectivamente, en comparación con las muestras sin estabilizante; después del día 9, en ambas subpoblaciones se observa una disminución en el FSC y SSC cuando se encuentran a 4°C, 25°C y 37°C. La subpoblación de linfocitos es la que mejor se preserva a 4°C y 25°C conservando características de FSC y SSC similares a la muestra basal, pues cuando se encuentran a 37°C se observa una reducción en el FSC y SSC (15, 24).

Adicionalmente, se han realizado análisis inmunofenotípicos con el fin de saber si las subpoblaciones celulares conservan o no la expresión de sus marcadores. Muestras de SP estabilizadas e incubadas a 4°C, conservan en los linfocitos la expresión de CD45, CD3 y CD38 después de 10 días de almacenamiento (15); En muestras de sangre total (ST) y SP obtenida por separación mediante gradiente de densidad que fueron estabilizadas y almacenadas a 25°C y 37°C se evaluaron marcadores inmunofenotípicos de LT, donde se conserva la expresión de CD45 hasta por 9 días a 25°C y 37°C; CD3 y CD4 hasta por 3 días a 37°C y 7 días a 25°C, de igual manera muestras de SP, sangre de cordón umbilical y sangre fetal estabilizadas e incubadas a 20°C conservan la expresión de CD45 hasta por 9 días (18,24). En otro estudio, se evaluó la expresión de CD45 tanto en monocitos como en linfocitos a diferentes concentraciones celulares (30.000, 60.000 y 120.000 células/ul) en

ST y muestras de SP obtenida por separación mediante gradiente de densidad almacenadas a 4°C donde ambas mantuvieron estable la intensidad de fluorescencia de CD45 al día 9; resultados similares se encontraron en monocitos estabilizados e incubados a 4°C donde se observó una ligera reducción en la expresión del CD45 al día 4 de almacenamiento la cual se mantuvo estable hasta el día 10 (15, 24). En cuanto a los granulocitos, cuando se estabilizaron e incubaron a 4°C se observó una importante reducción en la expresión de CD45 en el 20% y 30% de las células al día 4 y al día 10 respectivamente, comparado con la expresión celular basal de CD45 (15). Además, Canónico et al en el 2010 evaluó y concluyó que las muestras estabilizadas con TransFix™ en diluciones 1/5 y 1/10 e incubadas a 4°C, 25°C y 37°C durante 14 días conservan la expresión de CD45 en linfocitos, monocitos y granulocitos, no afectando entonces la dilución en la que se utilice el TransFix™ respecto a la expresión de CD45 (24).

Finalmente, análisis morfológicos fueron realizados por microscopía electrónica en muestras de SP sin y con estabilizante, almacenadas a 4°C, 25°C y 37°C por 10 días, donde los linfocitos almacenados 4°C no evidencian cambios a los 4 días (en muestras con y sin estabilizante) y a los 10 días ya se observan patrones necróticos aunque conservan la integridad de su membrana; a los 9 días de incubación a 25°C y 37°C en las muestras sin estabilizante se observan signos de necrosis y pérdida de la integridad de la membrana en todas las células, por el contrario en las muestras estabilizadas la membrana celular y los componentes citoplasmáticos se encuentran bien preservados en todas las células, no se observan patrones apoptóticos y rara vez se encuentran características de necrosis. Por el contrario los granulocitos almacenados a 4°C, al día 4 evidencian características iniciales de apoptosis en las muestras sin tratar y en las tratadas se observan patrones de necrosis, al día 10 en las muestras sin estabilizante la mayoría de los granulocitos entraron en apoptosis y en las muestras estabilizadas se evidencian características de necrosis (15,24).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del estabilizante Transfix™ en diferentes subpoblaciones celulares de médula ósea humana.

4.2 Objetivos específicos

- Analizar diferentes parámetros celulares como viabilidad, recuentos absolutos y relativos, canales medios de fluorescencia de marcadores fenotípicos y morfología de subpoblaciones celulares de médula ósea preservada o no con TransFix™.
- Describir las recomendaciones técnicas del uso del TransFix™ en médula ósea en la fase pre-analítica en citometría de flujo (temperatura, tiempo, etc) para su posterior aplicación en los servicios de citometría.

5. METODOLOGÍA

5.1 Recolección de muestras de médula ósea

En el presente estudio se procesaron y evaluaron en total 5 muestras de M.O obtenidas en EDTA mediante aspirado de cresta iliaca posterior (12), (3 mujeres y 2 hombres; mediana: 52 años, rango: 29 – 81 años) procedentes del Centro Javeriano de Oncología-Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) Bogotá-Colombia. Las muestras se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: periodo de obtención de la muestra no mayor a 24 horas desde su obtención hasta el inicio del estudio, volumen mayor a 1.6 ml, ausencia de infiltración medular por tumores de origen hematológico y/o tumores sólidos.

5.2 Análisis inmunofenotípico mediante CFM

Para analizar el efecto del estabilizante TransFix™ en los recuentos relativos y absolutos, en la expresión de distintos marcadores asociados a diferenciación celular y en la viabilidad celular, alícuotas de 400 ul de muestra de M.O sin y con estabilizante (dilución 1/10) (5,13-15) fueron evaluadas de acuerdo a la temperatura de almacenamiento: temperatura ambiente (18-24 °C) y refrigeración (4°C) y a diferentes tiempos (basal, 24 horas, 48 horas y 72 horas). Una vez realizados los diferentes tratamientos, las muestras fueron marcadas con un panel de anticuerpos monoclonales en combinación de 6 fluorescencias distintas (Fluorocromos: FITC/PE/PERCPCY5.5/PECY7/APC/APCCY7) empleado en la rutina clínica para el estudio de leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos crónicos y síndromes mielodisplásicos, con un protocolo de marcaje celular de antígenos de membrana (Tablas 1 y 2) para identificar y cuantificar distintas subpoblaciones celulares de origen mieloide y de origen linfoide en M.O. Para analizar el linaje mieloide se utilizó la combinación de anticuerpos: CD34/CD11b/HLA-DR/CD117/CD13/CD45 y para el linaje linfoide: CD34/CD10/CD19/CD38/CD20/CD45.

Para llevar a cabo el marcaje de las muestras, se dispensaron 35ul/tubo (1 tubo por panel evaluado) de muestra de M.O (con y sin TransFix™, T° ambiente y 4°C), posteriormente se adicionó la cantidad adecuada de anticuerpos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 500 ul de solución de lisis (FACS lysing solution-BDB) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se realizó un lavado con 2 ml de PBS, seguido de centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm (14), finalmente se le adicionó a cada tubo 350 ul de FACS Flow para realizar la adquisición en el citómetro. Una vez realizado el marcaje y comprobada la compensación y calibración del citómetro, a cada tubo se le adicionó 20 ul de esferas fluorescentes (Cytocount-Dako) con el fin de realizar los recuentos absolutos de las distintas subpoblaciones celulares presentes en M.O y posteriormente las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto II BDB. La adquisición de las muestras se llevó a cabo en dos pasos, en un primer paso se adquirieron 50.000 eventos totales y en un segundo paso se realizó un “gate” para el análisis de células precursoras CD34+ debido a su baja frecuencia (17).

Para el análisis de la viabilidad celular, se realizó la tinción de una alícuota (20 ul) de M.O con y sin estabilizante en los diferentes tiempos y temperaturas previamente descritas, con el colorante de viabilidad celular 7-AAD BDB validado a nivel clínico (18). Para llevar a cabo ésta tinción, 5 ul de 7-AAD previamente diluido con PBS (dilución 1/100) fueron adicionados a las muestras de M.O y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, a continuación las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo donde se almacenó la información de un total de 50.000 eventos totales para su posterior análisis.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de subpoblaciones celulares de linaje mieloide en M.O normales en combinaciones de 6 fluorescencias diferentes.

CD	Fluorocromo	Clon	Casa Comercial	Reactividad
CD34	FITC	8G12	BDB	Células progenitoras hematopoyéticas.
CD11b	PE	M1/70	BDB	Línea granulocítica: (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, células dendríticas mieloides.
HLA-DR	PERCPY5.5	L243	BDB	Células progenitoras hematopoyéticas, monocitos, células dendríticas, linfocitos B, linaje mieloide (línea granulocito-neutrófilo, monocitos).
CD117	PECY7	104D2	BDB	Precursores mieloides, mastocitos, promielocitos.
CD13	APC	WM15	BDB	Linaje mieloide (precursores mieloides, línea granulocítica: neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, células dendríticas.
CD45	APCCY7	2D1	BDB	Antígeno común leucocitario.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para el marcaje de subpoblaciones celulares de linaje linfoide en M.O normales en combinaciones de 6 fluorescencias diferentes.

CD	Fluorocromo	Clon	Casa Comercial	Reactividad
CD34	FITC	8G12	BDB	Células progenitoras hematopoyéticas.
CD10	PE	HI10a	BDB	Células Pre-B-I, células Pre-B-II y células B inmaduras, neutrófilos maduros
CD19	PERCPy5.5	4G7	BDB	Linaje linfoide B, excepto células Pro-B.
CD38	PECy7	HB7	BDB	Células Pre-B-II, células plasmáticas, timocitos, linfocitos T activados, células NK, mieloblastos y eritroblastos.
CD20	APC	L27	BDB	Células Pre-B-II, células B inmaduras y células B maduras.
CD45	APCCy7	2D1	BDB	Antígeno común leucocitario.

5.3 Análisis de la morfología celular de las muestras de MO

Para llevar a cabo el análisis de los elementos celulares presentes en la M.O, se realizaron extendidos de M.O de muestras sin estabilizar y estabilizadas con TransFix™ a diferentes tiempos y diferentes condiciones de temperatura previamente descritos. Una preparados los extendidos, las láminas fueron teñidas con colorante de Wright (químicos Albor) por un periodo de 6 minutos, seguido de Buffer Giordano (químicos Albor) (dilución 1/10 con agua destilada) durante 20 minutos (tiempos estandarizados por la sección de hematología del laboratorio clínico del HUSI) y finalmente fueron selladas con citoresin-60 (proquilab) para su lectura. La lectura fue realizada por un experto en el estudio de mielogramas en la rutina de pacientes con enfermedades hematológicas y no hematológicas. Se evaluaron diferentes parámetros morfológicos en los linajes granulocítico, monocítico, linfoide y eritroide teniendo en cuenta las características del núcleo, citoplasma, tamaño y color.

5.4 Análisis de resultados

El análisis de los datos de CFM fue realizado empleando el programa Paint-A-Gate PRO (BDB) (utilizado en la rutina clínica), realizando en un primer paso la selección de los singletes por FSC-H y FSC-A, y en un segundo paso la selección de las esferas y las células para realizar los recuentos absolutos de células/ul presentes en cada tubo (Figura 1).

Para calcular el número absoluto del total de células presentes en cada tubo, se aplicó la siguiente fórmula (CytoCount-Dako) (6):

$$\left[\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de esferas CytoCount™ contadas}} \times \frac{\text{concentración de CytoCount™}}{\text{volumen de esferas}} = \text{Número de células/ul} \right]$$

Donde **Número de células contadas:** número de células totales obtenidas. **Número de esferas CytoCount™ contadas:** Número de eventos de esferas de la misma muestra que la de las células en cuestión. **Concentración de CytoCount™:** Número de esferas/ul que se indica en el vial. **Volumen de esferas:** volumen de esferas adicionado por tubo.

Posteriormente, para el análisis de las células CD34+ se realizó un “gate” con el fin de obtener un mayor número de células, debido a que normalmente hay baja frecuencia de éstas (inferior al 3% de la celularidad total) (Figura 2). Adicionalmente, se evaluó el canal medio de fluorescencia (CMF) para cada uno de los antígenos en las subpoblaciones celulares, el porcentaje de viabilidad celular y los recuentos absolutos y relativos de las diferentes subpoblaciones.

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un análisis descriptivo determinando para las variables cuantitativas: medianas y rangos, empleando el paquete estadístico SPSS versión 17 y GraphPad Prism 5.0. y se aplicó la prueba U de Mann Whitney. Se consideraron como diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

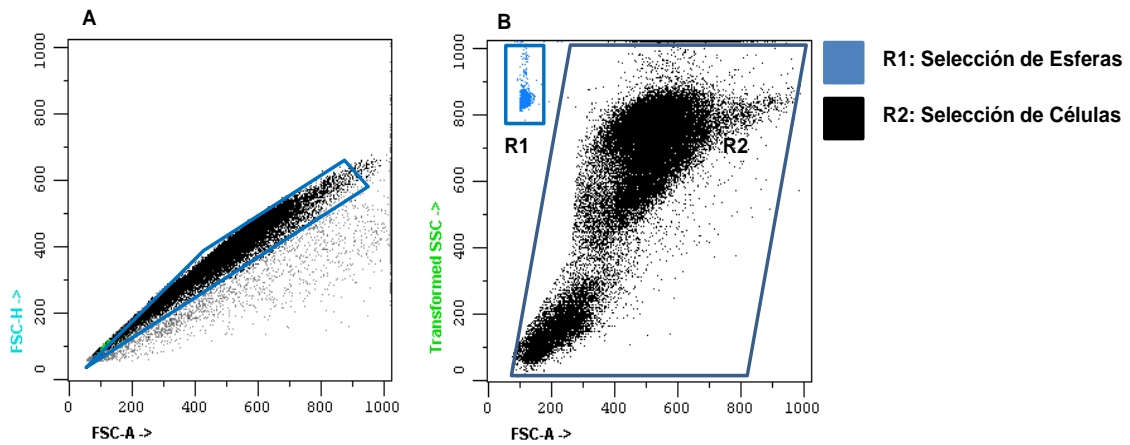


Figura 1. Ejemplo representativo del análisis por CFM de selección de células en singletes y esferas en una muestra de M.O para estimar el recuento absoluto (células/ul) presentes en cada tubo. En el panel A se seleccionaron los singletes (eventos rodeados de color azul) en un dot plot de FSC-A (*forward scatter* área) vs FSC-H (*forward scatter* altura). El panel B, muestra la región de esferas (R1) y la región de células (R2) en un dot plot de tamaño (*forward scatter*-FSC) vs complejidad (*side scatter*-SSC).

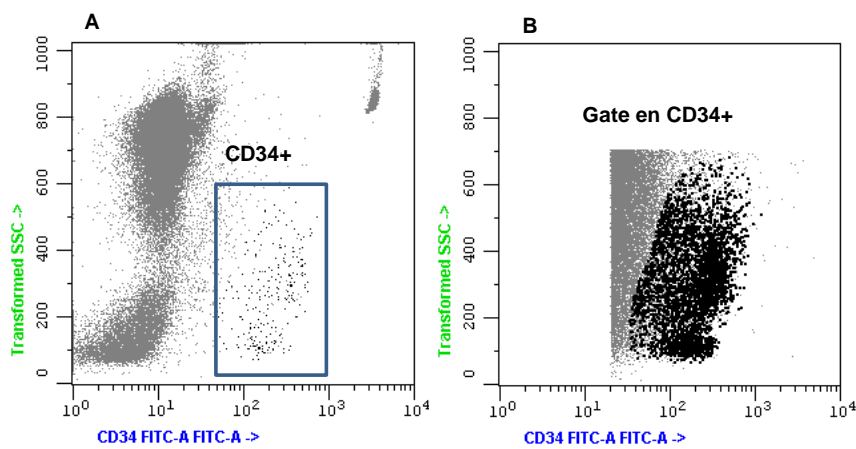


Figura 2. Ejemplo de la selección (*gate*) de células CD34+. En el panel A se observan en el recuadro azul las células CD34+ en términos de complejidad vs expresión de CD34. En el panel B se observa que después de realizado el “gate” de eventos CD34+ (eventos de color negro), se incrementa de forma significativa el número de células CD34+ con fuerte expresión de ésta molécula.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de viabilidad celular con 7-AAD

La tinción supravital con 7-AAD fue utilizada para detectar el porcentaje de células muertas en muestras sin y con estabilizante celular TransFix™, los resultados muestran que el tratamiento con TransFix™ mantiene la viabilidad celular a diferentes tiempos y condiciones de temperatura. Por otro lado, en las muestras sin estabilizante se observa un menor porcentaje de células vivas traducido como un aumento en el porcentaje de células positivas para 7-AAD (Figura 3).

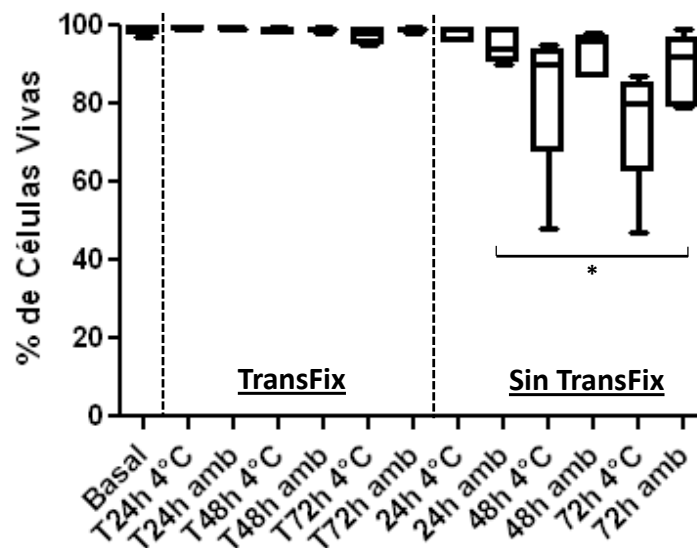


Figura 3. Porcentajes de células vivas en muestras teñidas con 7-AAD estabilizadas o no con TransFix™ y almacenadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y temperaturas (4°C y temperatura ambiente). Como se observa en la figura, los porcentajes de células vivas en las muestras estabilizadas fueron muy similares a las muestras en condición basal; por el contrario las muestras sin estabilizante tuvieron un menor porcentaje de células viables que fue disminuyendo con el tiempo. * $p < 0,05$ respecto al Basal.

6.2 Análisis de los recuentos absolutos totales en muestras de M.O

El análisis comparativo entre las 5 muestras de M.O, evidencia que en general hay una disminución en el número total de células/ul al comparar con los recuentos celulares calculados en la muestra basal; sin embargo, el tratamiento con TransFix™ mantiene los recuentos celulares absolutos. Al analizar los hallazgos en cada muestra de forma individual, existe variabilidad en los

recuentos en cada muestra analizada; como se observa en la figura 4A (MO 1) el almacenamiento de la muestra de M.O a una temperatura de 4°C con y sin estabilizante afecta de forma importante los recuentos celulares. Por otra parte, en la figura 4B (MO 3), el tratamiento con TransFix™ tanto a 4°C como a temperatura ambiente mantiene los recuentos celulares absolutos al comparar con las muestras no estabilizadas. Adicionalmente, el almacenamiento a 4°C sin estabilizante reduce de forma significativa los recuentos absolutos.

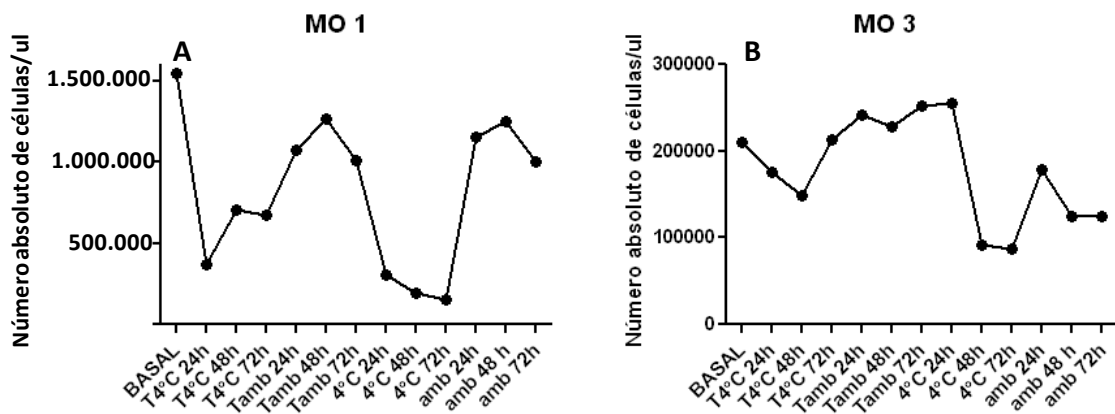


Figura 4. Valores absolutos totales de muestras con y sin estabilizante celular TransFix™ almacenadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y temperaturas (4°C y ambiente). (4A) Médula ósea 1, (4B) Médula ósea 3.

6.3 Recuentos celulares relativos de subpoblaciones celulares en MO

El análisis de los recuentos celulares relativos de la línea granulocítica (LG) (Figura 5A), muestra una disminución de estos recuentos en las muestras de M.O almacenadas a 4°C durante 48 y 72 horas siendo la diferencia significativa respecto al recuento basal, a las 72 horas. En el linaje monocítico (Figura 5B), se observa un incremento significativo en el porcentaje de esta línea, en las muestras estabilizadas con TransFix™ respecto al basal a las 48 horas, tanto a 4°C como a temperatura ambiente. Los recuentos relativos son similares al basal a las 24 y 48 horas de almacenamiento a temperatura ambiente sin estabilizante, pero cuando completan 72 horas de almacenamiento se reducen los recuentos relativos en comparación entre muestras estabilizadas y no estabilizadas.

Los recuentos relativos de la línea linfoide y de las células CD34+ mieloides y CD34+ linfoides, se mantienen estables a través del tiempo hasta 72 horas a diferentes temperaturas (4°C y ambiente) comparadas con las muestras basales (Figuras 5C y 5 E-F). A pesar que en la línea eritroide no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes a diferentes tratamientos, si se observa un incremento de esta línea en las muestras almacenadas a 4°C sin estabilizante tanto a las 48 horas como a las 72 horas (Figura 5D).

6.4 Análisis del parámetro de dispersión: FSC (tamaño)

El linaje granulocítico es la subpoblación celular más afectada en términos de FSC (bajo FSC ó pérdida de tamaño) en las muestras con y sin estabilizante (Figura 6A), siendo esta disminución mucho más crítica en las muestras de M.O no estabilizadas. Contrario a lo observado en la línea granulocítica, el parámetro FSC se encuentra significativamente elevado (mayor tamaño) en las demás líneas celulares analizadas (monocítica, linfoide, eritroide y células CD34+) (Figura 6, paneles B-F) en las muestras estabilizadas con TransFix™. Las muestras sin estabilizante conservan el menor valor de FSC respecto a las muestras estabilizadas y a su vez presentan valores similares a las muestras basales.

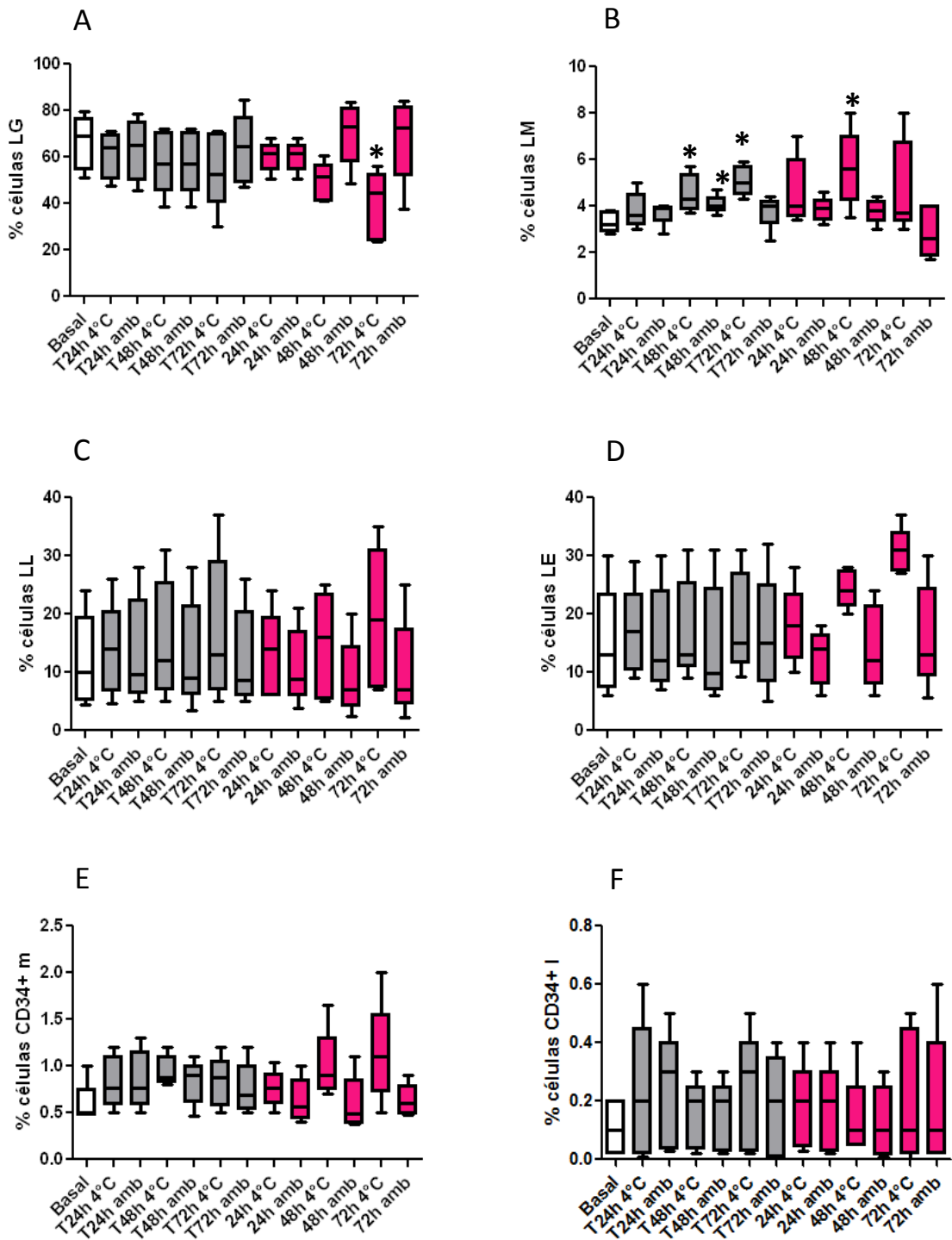


Figura 5. Recuentos celulares relativos de los linajes granulocítico (LG) (panel A), monocítico (LM) (panel B), linfoide (LL) (panel C), eritroide (LE) (panel D) y de células CD34+ de origen mieloide y linfoide (paneles E y F; respectivamente) a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular (cajones grises y fucsias respectivamente) comparadas con las muestras basales (cajón blanco). En general, los recuentos relativos de los 6 diferentes linajes estabilizados con TransFix™ se mantienen estables en el tiempo a diferentes temperaturas. * $p < 0,05$ respecto al basal

6.5 Análisis del parámetro de dispersión: SSC (complejidad interna)

Este parámetro es bajo en la línea granulocítica con y sin estabilizante, es decir el tiempo y la temperatura afectan de forma relevante este parámetro de forma independiente, induciendo hipogranularidad en estas células (Figura 7A). De forma similar, el SSC del linaje monocítico es bajo en las muestras estabilizadas y almacenadas a 4°C y en las muestras sin estabilizar almacenadas a temperatura ambiente (Figura 7B). A su vez, el linaje linfóide muestra valores significativamente bajos de SSC, cuando estas se encuentran estabilizadas con TransFix™. En las M.O sin estabilizar este parámetro cae de forma significativa desde las 24 horas siendo mucho más bajo a las 72 horas (Figura 7C).

Contrario a lo anteriormente descrito, en el linaje eritroide el parámetro SSC es alto en todas las muestras estabilizadas, mientras que en las muestras sin estabilizar el SSC es bajo respecto a éstas y se conserva respecto a las muestras basales (Figura 7D). En las subpoblaciones celulares CD34+ mieloides y linfoides el parámetro SSC se conserva en todas las muestras con y sin estabilizante (Figuras 7E, F).

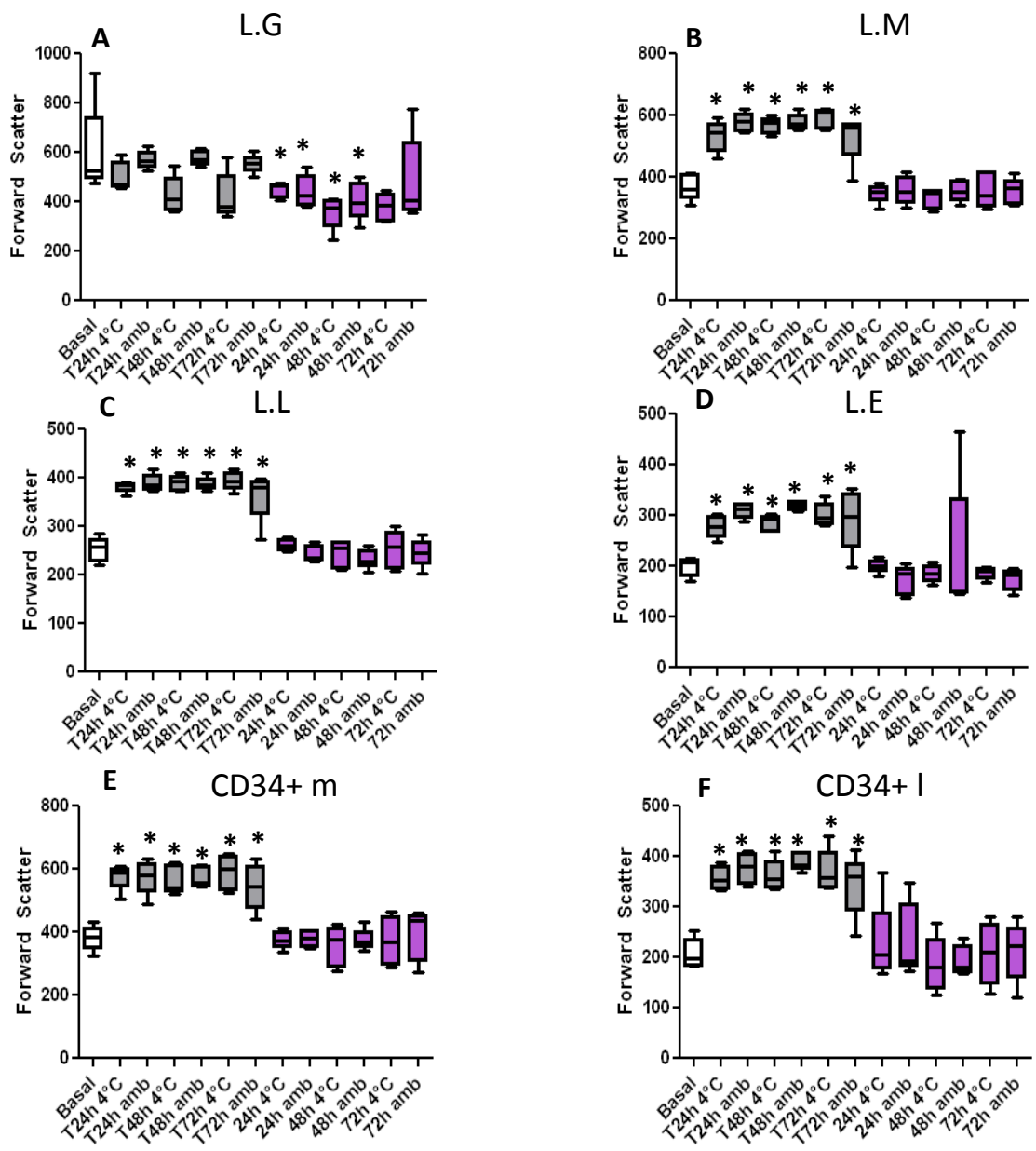


Figura 6. Análisis del FSC de 6 diferentes linajes celulares de M.O a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular (cajones grises y morados respectivamente) comparadas con las muestras basales (cajón blanco): (A) linaje granulocítico (L.G), (B) linaje monocítico (L.M), (C) linaje linfóide (L.L), (D) linaje eritroide (L.E), (E) células CD34+ mieloides (CD34+ m) y (F) células CD34+ linfoides (CD34+ l). *p<0,05 respecto al basal.

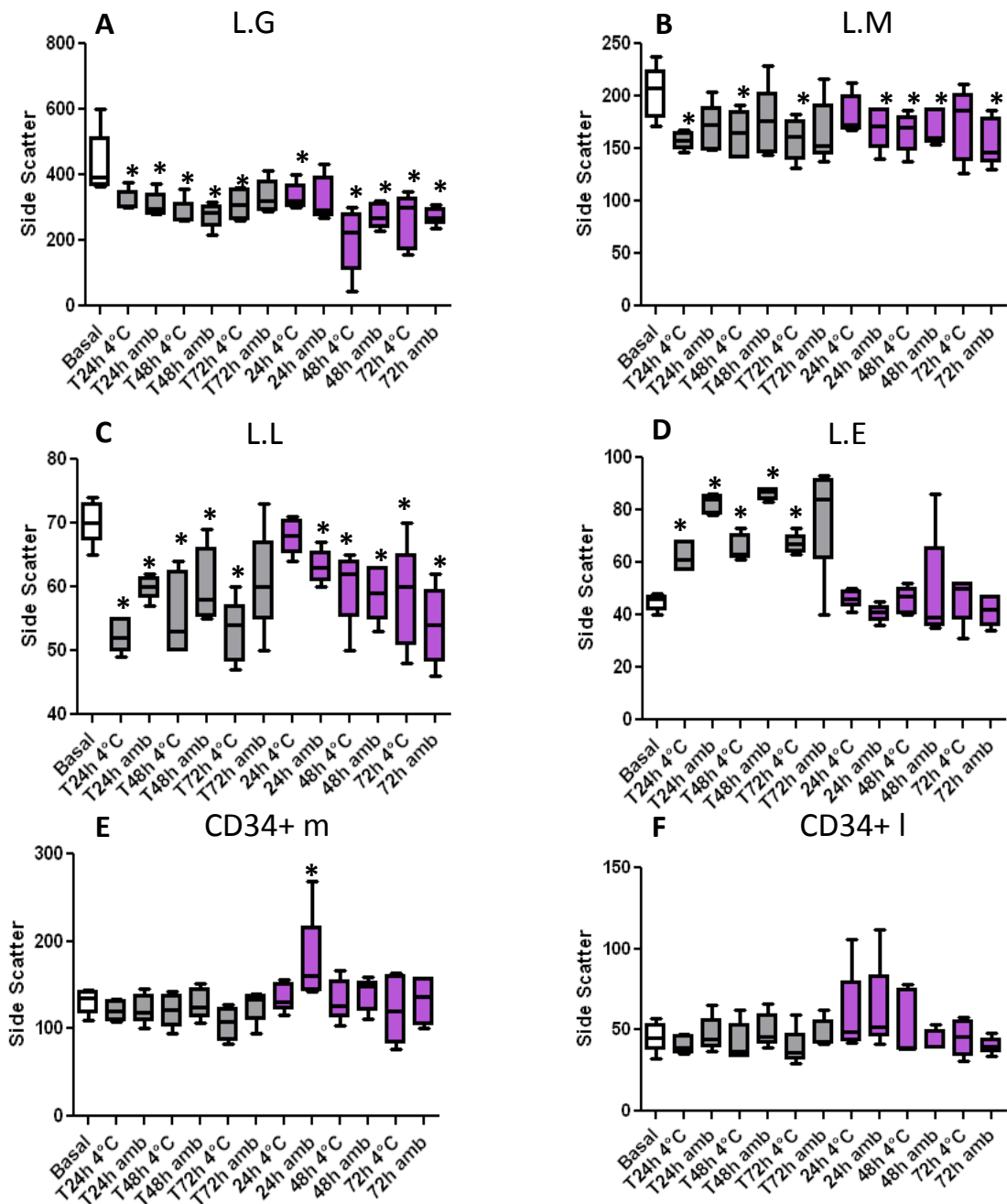


Figura 7. Análisis del SSC de 6 diferentes linajes celulares de M.O a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular (cajones grises y morados respectivamente) comparadas con las muestras basales (cajón blanco): (A) linaje granulocítico (L.G), (B) linaje monocítico (L.M), (C) linaje linfoide (L.L), (D) linaje eritroide (L.E), (E) células CD34+ mieloides (CD34+ m) y (F) células CD34+ linfoides (CD34+ l). * $p < 0,05$ respecto al basal.

6.6 Evaluación de los CMF de diferentes marcadores celulares en muestras de M.O.

Uno de los marcadores más importantes en los análisis inmunofenotípicos mediante citometría es la molécula CD45 ya que permite diferenciar de acuerdo a sus niveles de expresión distintas subpoblaciones leucocitarias en muestras biológicas. En el presente estudio, observamos que el CMF de CD45 disminuye de forma significativa en todas las líneas celulares evaluadas tanto en las muestras estabilizadas como en las no estabilizadas, excepto en las células CD34+ linfoides donde a pesar que el CMF disminuye, sus valores no son estadísticamente significativos en comparación con las células CD34+ linfoides en condición basal. Además, esta disminución es superior en las muestras tratadas con TransFix™ en todos los tiempos y temperaturas evaluadas (Figura 8).

Otras moléculas evaluadas en términos de CMF fueron CD10 en neutrófilos maduros, CD11b y CD13 en línea monocítica, CD34 en progenitores, CD19 y CD20 en linfocitos B (LB) y CD38 en células plasmáticas (Figura 9). Los resultados muestran que el tratamiento con TransFix™ a diferentes tiempos y temperaturas induce disminución significativa de CD10 en neutrófilos, de CD19 en linfocitos B y de CD11b en monocitos. A pesar de que las moléculas CD20 en linfocitos B y CD34 en progenitores mieloides tuvieron una disminución en sus valores, estos no fueron estadísticamente significativos. La expresión de CD34 en progenitores linfoides, de CD13 en monocitos y de CD38 en células plasmáticas no se vio afectada.

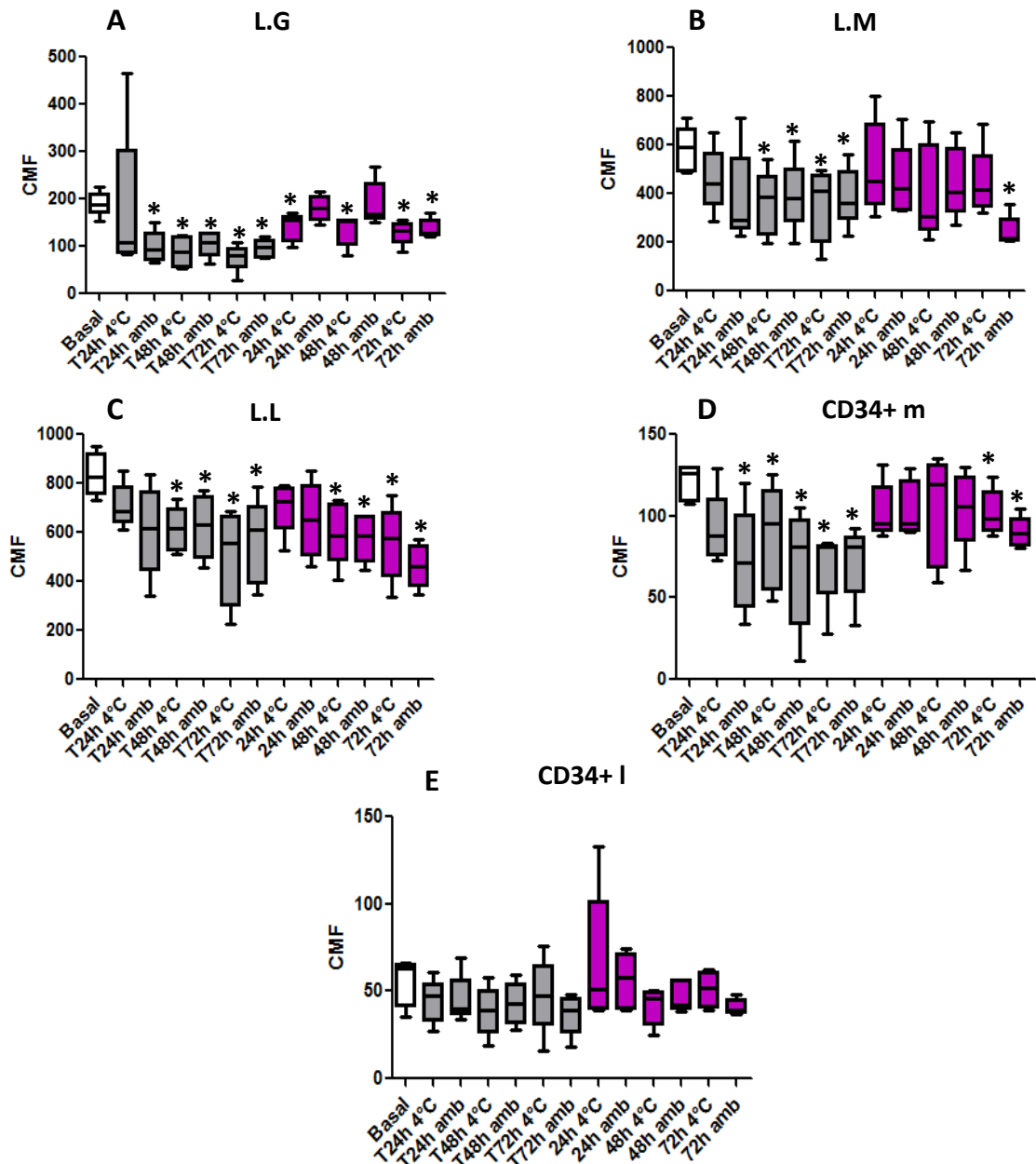


Figura 8. Evaluación del canal medio de fluorescencia de CD45 en 5 diferentes linajes celulares de M.O a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular (cajones grises y morados respectivamente) comparadas con las muestras basales (cajón blanco): (A) linaje granulocítico (L.G), (B) linaje monocítico (L.M), (C) linaje linfóide (L.L), (D) células CD34+ mieloides (CD34+ m) y (E) células CD34+ linfoides (CD34+ I). *p<0,05 respecto al basal.

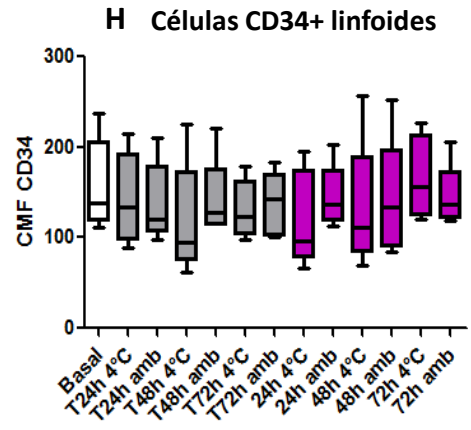
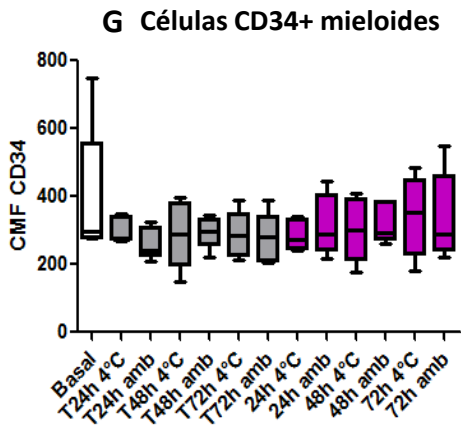
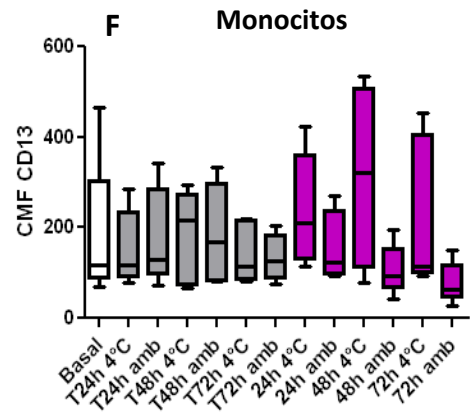
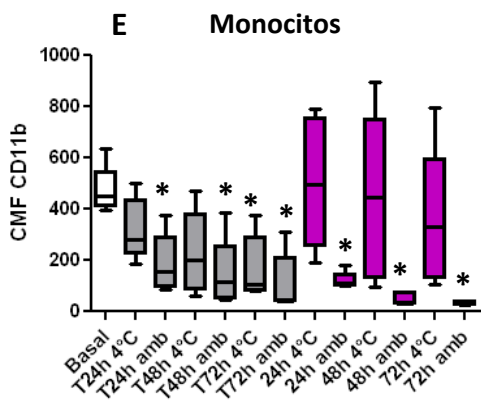
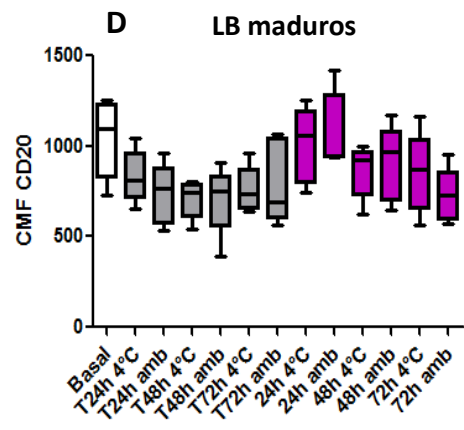
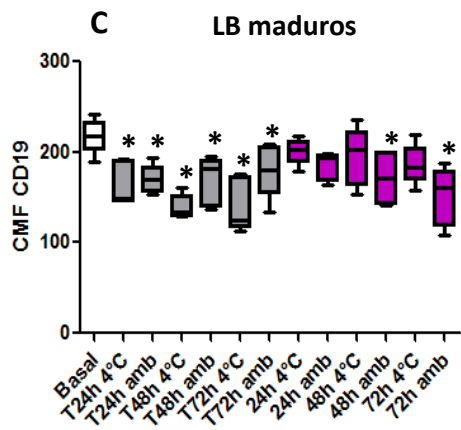
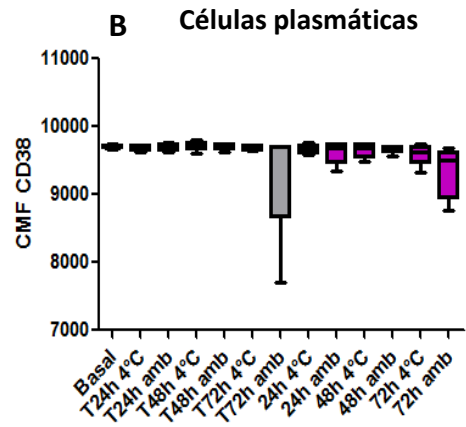
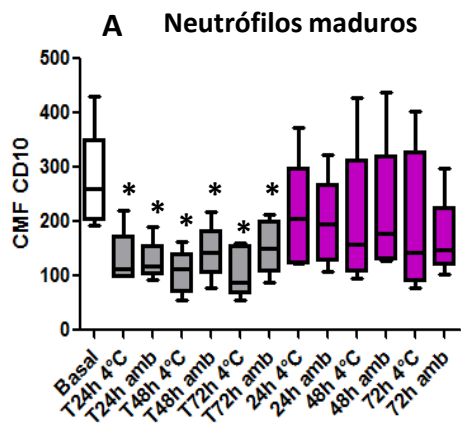


Figura 9. Evaluación del canal medio de fluorescencia de 8 antígenos de membrana en 6 diferentes linajes celulares de M.O a diferentes tiempos y temperaturas, con y sin estabilizante celular (cajones grises y morados respectivamente) comparadas con las muestras basales (cajón blanco): (A) CD10 en neutrófilos maduros; (B) CD38 en células plasmáticas; (C) CD19 y (D) CD20 en linfocitos B; (E) CD11b y (F) CD13 en monocitos; (G) CD34 en progenitores mieloides y (H) CD34 en progenitores linfoides. * $p < 0,05$ respecto al basal.

6.7 Análisis de la morfología celular de muestras de M.O

El análisis de la morfología celular mostró que en condiciones basales (Figura 10), las células no evidencian alteraciones importantes en el núcleo, citoplasma, tamaño o grado de basofilia. Sin embargo a partir de las 24 horas (Figuras 11-13) tanto las muestras no estabilizadas como las estabilizadas empiezan a presentar alteraciones en la morfología encontrándose, que en las muestras sin TransFix™ hay presencia de vacuolas, alteraciones en la condensación de la cromatina y mayor grado de picnosis. Por otra parte, en las muestras estabilizadas no se observan vacuolas en las líneas celulares evaluadas, pero si hay escaso citoplasma, condensación de la cromatina y mayor grado de basofilia.

Dentro de las principales alteraciones en la línea granulocítica, se observa picnosis tanto en muestras estabilizadas como sin estabilizar, siendo éste parámetro significativamente mayor en las muestras sin estabilizante (Figura 14A). Por otro lado, las muestras estabilizadas con TransFix™ a partir de las 48 horas presentan un alto grado de basofilia observada en el 100% de los casos en las muestras almacenadas a temperatura ambiente y a 4°C (Figura 14B). Finalmente, todas las muestras sin estabilizante presentan vacuolas, siendo éste parámetro estadísticamente significativo en las muestras almacenadas a temperatura ambiente después de 48 horas (Figura 14C).

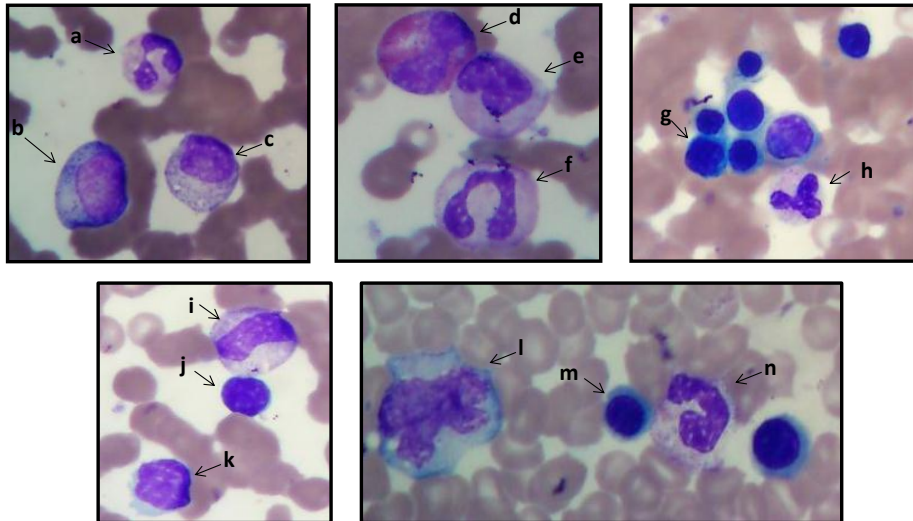


Figura 10. Morfología celular de la M.O basal. Diferentes tipos celulares presentes en las muestras de M.O sin evidencia de alteraciones.(a) neutrófilo, (b) promielocito, (c) mielocito, (d) eosinófilo, (e) metamielocito, (f) neutrófilo, (g) normoblasto policromático, (h) neutrófilo, (i) metamielocito, (j) linfocito, (k) monocito, (l) monocito, (m) normoblasto policromático, (n) neutrófilo.

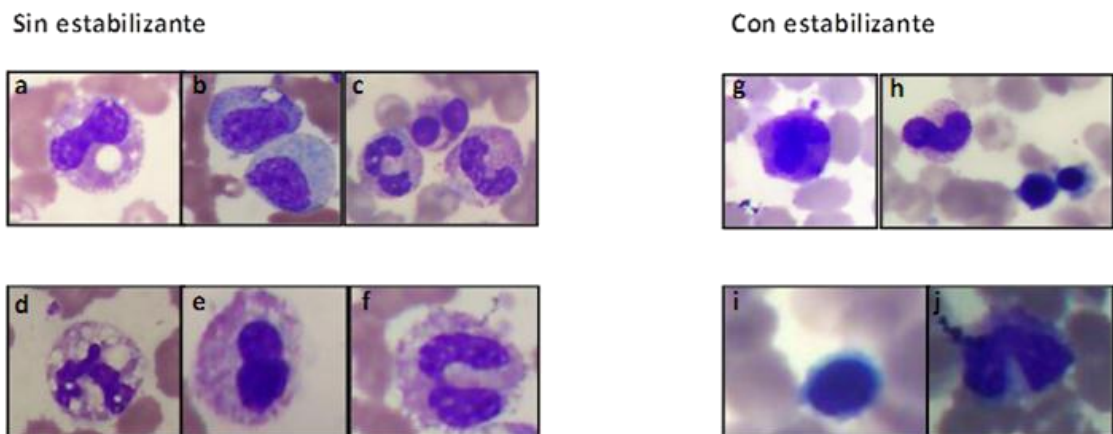
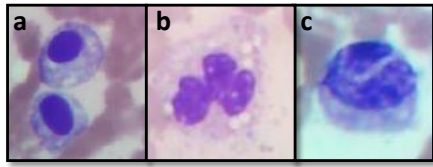


Figura 11. Morfología celular de muestras de M.O sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 24 horas. En los paneles a-f se encuentran las muestras sin estabilizante almacenadas a temperatura ambiente (a-c) y a 4°C (d-f). En la línea granulocítica se observan vacuolas (a, b, d) y alteraciones en la condensación de la cromatina (c-f). En los paneles g-j se encuentran las muestras estabilizadas con TransFix™, almacenadas a temperatura ambiente (g-h) y a 4°C (i-j). En las muestras estabilizadas se observa condensación de la cromatina y aumento en el grado de basofilia (g-i), alteraciones del borde citoplasmático (h) y escaso citoplasma (i).

Sin estabilizante



Con estabilizante

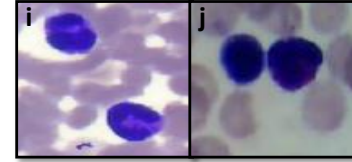
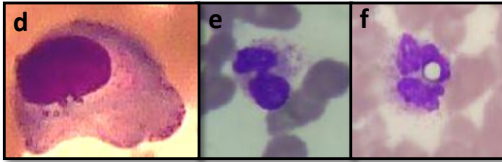
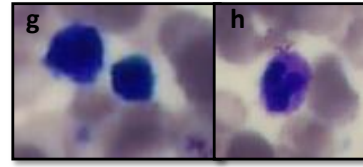
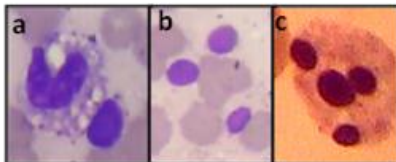


Figura 12. Morfología celular de muestras de M.O sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 48 horas. En los paneles a-f se encuentran las muestras sin estabilizante almacenadas a temperatura ambiente (a-c) y 4°C (d-f). En estas células se evidencia picnosis nuclear (a, d), vacuolización en las líneas monocítica y granulocítica (b, f), hipogranularidad en la línea granulocítica (c) y pérdida gradual del citoplasma (e-f). En los paneles g-j se encuentran las muestras estabilizadas con TransFix™, almacenadas a temperatura ambiente (g-h) y a 4°C (i-j). Se observa condensación de la cromatina y aumento en el grado de basofilia (g-j), lo que dificulta la diferenciación celular.

Sin estabilizante



Con estabilizante

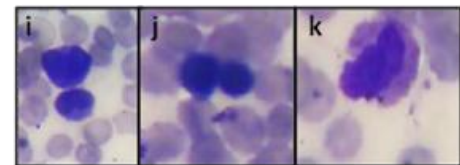
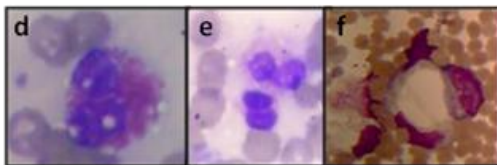
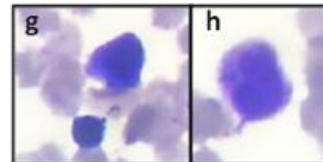


Figura 13. Morfología celular de muestras de M.O sin y con estabilizante TransFix™, almacenadas a diferentes temperaturas y observadas a las 72 horas. En los paneles a-f se encuentran las muestras sin estabilizante almacenadas a temperatura ambiente (a-c) y a 4°C (d-f). En estas células se observa mayor grado de restos nucleares (a, b), picnosis nuclear (c), vacuolización (d) y destrucción celular (e-f). En los paneles g-k, se encuentran las muestras estabilizadas con TransFix™, almacenadas a temperatura ambiente (g-h) y a 4°C (i-k). Se observa condensación de la cromatina y aumento en el grado de basofilia (g-k), lo que dificulta la diferenciación celular.

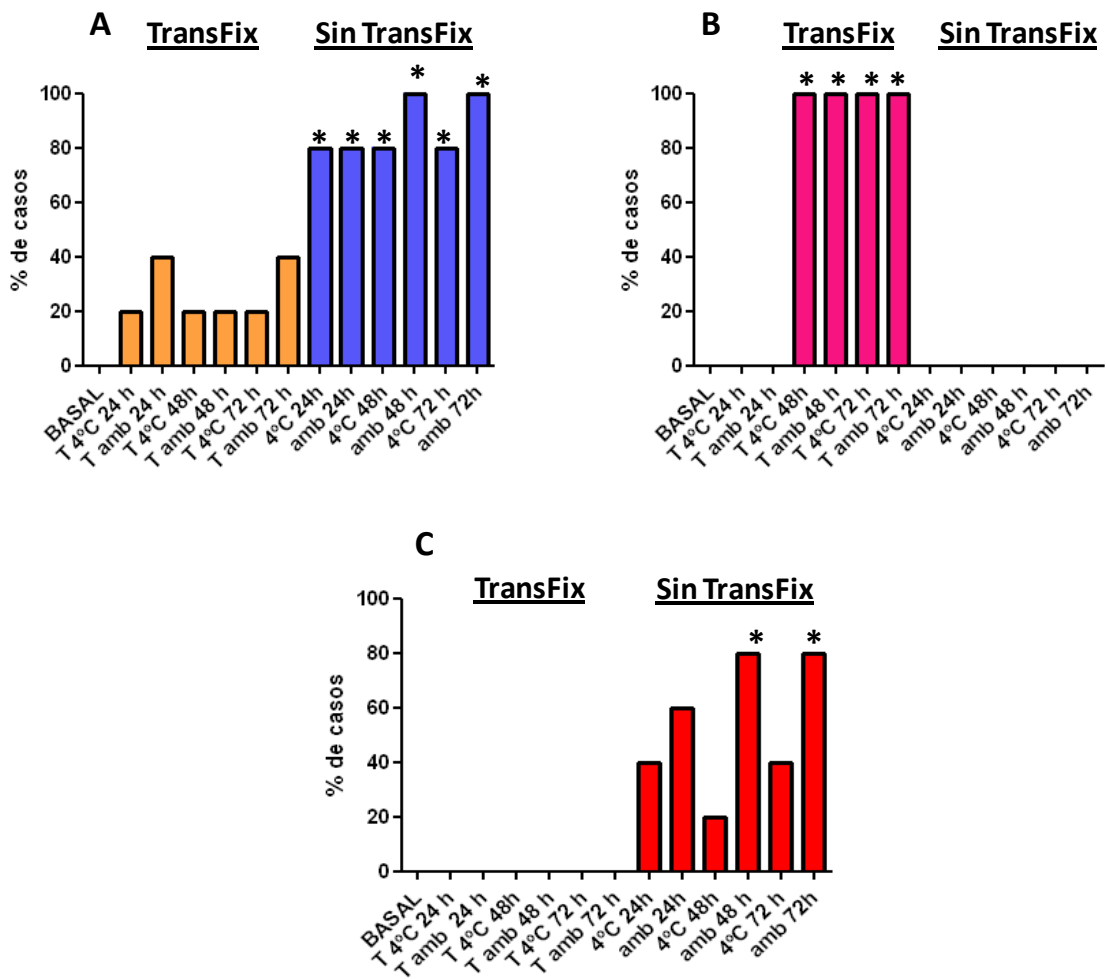


Figura 14. Principales alteraciones en el linaje granulocítico. (A) Pícnosis nuclear, (B) Grado de basofilia, (C) Presencia de vacuolas. * $p < 0,05$ respecto a las muestras en condición basal.

7. DISCUSIÓN

Hoy en día se sabe que en la fase pre-analítica de las pruebas de la laboratorio clínico, la calidad de la muestra puede verse afectada si no se analiza a tiempo, por ello es importante establecer el periodo de tiempo en que una muestra puede ser analizada desde su obtención y transporte al laboratorio y si es posible estabilizarla o no. En la rutina de los servicios de citometría, las muestras biológicas como SP y M.O deben analizarse en un periodo menor a 24 horas post-obtención; sin embargo, el uso de estabilizantes celulares como TransFix™ en muestras de SP y LCR ha permitido que estas muestras puedan analizarse en periodos mayores a 24 horas debido a que previenen la degeneración celular conservando diferentes parámetros celulares como la viabilidad, los recuentos celulares, la expresión de algunos antígenos de superficie y los parámetros de dispersión celular FSC y SSC hasta por 10 días (1-5). A la fecha no existen reportes en la literatura de sus efectos en muestras de M.O.

En nuestro estudio, se encontró que el estabilizante celular TransFix™ mantiene viables las células de la M.O por 72 horas a 4°C y a temperatura ambiente, teniendo un bajo porcentaje de células positivas para 7-AAD (<4%) respecto a las muestras sin estabilizante donde hubo mayor muerte celular siendo mas significativa cuando las muestras se encontraban almacenadas a 4°C, estos resultados difieren con los hallazgos publicados en otro estudio donde tanto las muestras estabilizadas como no estabilizadas con el paso de los días incrementaban gradualmente su positividad para 7-AAD cuando se encontraban almacenadas a 4°C (24).

Respecto a los valores absolutos en muestras de M.O con y sin estabilizante, nuestro estudio pone en evidencia que las muestras estabilizadas con TransFix™, mantienen estables los recuentos absolutos celulares por un periodo de 72 horas mostrando mejores resultados cuando las muestras se almacenan a temperatura ambiente, en cuanto a la muestras no estabilizadas se observa una disminución significativa en los recuentos cuando las muestras cumplen 72 horas de almacenamiento a 4°C, el único reporte en la literatura en

cuanto a éste parámetro evalúa 3 subpoblaciones celulares linfocitos, monocitos y granulocitos almacenadas a 4°C durante 10 días y observa, al igual que en nuestro estudio que hay un mayor porcentaje de recuperación celular en las muestras estabilizadas (>90%) (15). Por otra parte, algunos estudios han evaluado los recuentos relativos celulares de los linfocitos, monocitos y granulocitos de SP y han encontrado que las muestras estabilizadas y almacenadas a 4°C y a 25°C se mantienen estables con el tiempo (hasta 10 días), situación contraria a las muestras sin estabilizante donde ha habido mayor pérdida celular con el tiempo siendo la subpoblación de los granulocitos la más afectada (4, 15). Una de las posibles explicaciones asociadas a este fenómeno 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 (25). En nuestro estudio hemos encontrado hallazgos similares, ya que en las muestras estabilizadas se observa mayor recuperación celular respecto a las no estabilizadas. Además las muestras sin estabilizante almacenadas a temperatura ambiente presentan recuentos celulares más estables respecto a las muestras almacenadas a 4°C.

En cuanto a los parámetros de dispersión celular FSC y SSC evaluados en nuestro estudio, la línea granulocítica resultó ser la más afectada, pues tanto el FSC como el SSC disminuyeron de forma crítica en las muestras con y sin estabilizante almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente. Resultados similares fueron observados en otros estudios que evaluaron éstos parámetros en muestras de SP con y sin TransFix™, donde a las 24 horas las muestras con y sin estabilizante almacenadas a 4°C y 25°C empezaron a presentar alteraciones en la dispersión de la luz (pérdida del FSC y SSC) siendo esta pérdida cada vez más significativa con el tiempo (15, 24). Reportes en la literatura indican que en la línea monocítica a partir del día 4 hay una disminución en el FSC, mientras que en la línea linfoide este parámetro se conserva, respecto a los resultados basales hasta por 10 días, estos resultados se obtuvieron en muestras de SP y separadas por gradiente de densidad con y sin estabilizante almacenadas a 4°C y a 25°C. Respecto a nuestro estudio

encontramos hallazgos similares como el mantenimiento del FSC en la línea linfoide en muestras sin estabilizante y el mantenimiento de éste parámetro en la línea monocítica hasta por 3 días; y hallazgos diferentes, pues en nuestras muestras estabilizadas el parámetro FSC en los linajes monocítico y linfoide se encuentra significativamente elevado desde las 24 horas, mientras que en las no estabilizadas los valores de FSC son similares a las muestras basales hasta las 72 horas (15, 24).

Resultados reportados por algunos autores, demuestran que el SSC se mantiene estable en el linaje monocítico hasta las 72 horas y en el linaje linfoide hasta 10 días tanto en muestras estabilizadas como no estabilizadas a 4°C y a temperatura ambiente. Estos resultados difieren respecto a los nuestros, ya que en el linaje monocítico el SSC disminuye significativamente en las muestras estabilizadas y almacenadas a 4°C y en las muestras no estabilizadas almacenadas a temperatura ambiente a partir de las 24 horas de almacenamiento; en los otros tratamientos a pesar de presentarse valores bajos, no son estadísticamente significativos. Por otra parte, en el linaje linfoide el SSC es significativamente bajo en todas las muestras con y sin estabilizante. A la fecha no hay reportes de estudios que hayan evaluado los parámetros FSC y SSC en el linaje eritroide y en células CD34+ mieloides y linfoides, nuestros resultados demuestran que el FSC aumenta de forma significativa a partir de las 24 horas en los linajes anteriormente mencionados cuando las muestras han sido estabilizadas, mientras que se mantiene estable respecto a las muestras en condición basal cuando las muestras no han sido estabilizadas. Respecto al SSC, en la línea eritroide este parámetro aumenta de forma significativa en muestras estabilizadas mientras que en muestras sin estabilizar se mantiene estable; en los progenitores mieloides y linfoides el parámetro se mantiene estable respecto a las muestras en condición basal cuando las muestras han sido estabilizadas y almacenadas tanto a 4°C como a temperatura ambiente.

Diversos autores han evaluado la expresión de CD45 en diferentes subpoblaciones celulares de muestras estabilizadas, dentro de ellas los

linfocitos, donde se ha evidenciado que en muestras almacenadas a 4°C, 20°C y 25°C la expresión de CD45 se conserva hasta por 9 días, caso contrario sucedió en nuestro estudio pues el CMF de CD45 en el linaje linfoide, tanto en las muestras estabilizadas como en las no estabilizadas, disminuyó a partir de las 24 horas de almacenamiento tanto a 4°C como a temperatura ambiente (15, 18, 24). Otra subpoblación evaluada fueron los granulocitos, donde las muestras estabilizadas y almacenadas a 4°C sufrieron una importante reducción en la expresión de CD45 a partir del día 4, en nuestro estudio revelamos este hallazgo en muestras estabilizadas a partir de las 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente y desde las 48 horas a 4°C, por otra parte se observó una expresión estable de ésta molécula hasta las 48 horas en las muestras almacenadas a temperatura ambiente sin estabilizante (15). En algunos estudios se ha observado que la expresión de CD45 en los monocitos almacenados a 4°C se mantiene estable hasta por 9 días o se evidencia una ligera reducción a partir del día 4 conservándose hasta el día 10 de almacenamiento, en nuestro estudio se observa disminución en la expresión de CD45 desde las 24 horas de almacenamiento en muestras estabilizadas con TransFix™, convirtiéndose esta reducción significativa, a partir de las 48 horas de almacenamiento, por el contrario la expresión de ésta molécula se mantiene estable (respecto a las muestras en condición basal) hasta las 48 horas en muestras sin estabilizante almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente (15, 24). A la fecha no hay reportes de estudios que hayan evaluado la expresión de CD45 en otras subpoblaciones, nosotros además evaluamos el CMF de ésta molécula en células CD34+ mieloides y linfoides, observando que en los progenitores mieloides la expresión de CD45 disminuye de forma significativa tanto en muestras estabilizadas como no estabilizadas almacenadas a 4°C y temperatura ambiente, mientras que en los progenitores linfoides a pesar de que el CMF disminuye, sus valores no son estadísticamente significativos en comparación con las muestras en condición basal. Tampoco existen reportes de estudios que hayan evaluado la expresión de CD10 en neutrófilos maduros, CD11b y CD13 en línea monocítica, CD34 en progenitores, CD19 y CD20 en linfocitos B y/o CD38 en células plasmáticas, nuestro estudio revela que la

expresión de CD34 en progenitores linfoides, de CD13 en monocitos y de CD38 en células plasmáticas no se ven afectadas cuando se estabilizan y almacenan a temperatura ambiente o 4°C hasta 72 horas, los demás marcadores evidenciaron disminución en sus valores a partir de las 24 horas cuando las muestras fueron estabilizadas con TransFix™.

En cuanto al análisis morfológico, la literatura reporta que los linfocitos empiezan a evidenciar patrones necróticos a partir de los 10 días de almacenamiento cuando las muestras han sido estabilizadas y almacenadas a 4°C; los granulocitos al día 4 empiezan a presentar características de apoptosis y necrosis en muestras con y sin estabilizante respectivamente, almacenadas a 4°C. Finalmente en muestras sin estabilizante almacenadas a 25°C todas las células empiezan a presentar signos de necrosis, mientras que las estabilizadas preservan tanto su membrana como sus componentes citoplasmáticos (15, 24). Nuestros estudios demuestran que a partir de las 24 horas tanto en las muestras estabilizadas como en las no estabilizadas, las células de linaje granulocítico, monocítico, linfoide y eritroide presentan alteraciones tanto nucleares como citoplasmáticas, dentro de las más representativas en las muestras estabilizadas se encuentran el incremento en el grado de basofilia, la cual aumenta gradualmente a partir de las 48 horas en muestras almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente; y condensación de la cromatina a partir de las 24 horas lo que dificulta la diferenciación celular. En las muestras no estabilizadas hay vacuolización celular en las líneas granulocítica y monocítica a partir de las 24 horas de almacenamiento y picnosis nuclear a partir de las 48 horas, tanto en muestras almacenadas a 4°C como a temperatura ambiente. Por lo que es claro que el TransFix™ afecta la morfología celular y no se recomienda su uso en este trabajo para este tipo de análisis.

8. RECOMENDACIONES Y CONCLUSIONES

La estabilización con TransFix™ de muestras de M.O anticoaguladas con EDTA permite:

1. El mantenimiento de la viabilidad celular hasta 72 horas después de la obtención de la M.O.
2. Identificar, caracterizar y cuantificar los diferentes linajes celulares presentes en M.O desde las subpoblaciones más inmaduras hasta las más maduras con mejores resultados hasta las 48 horas.
3. A pesar que los parámetros FSC, SSC y CD45 se alteran con el tratamiento con TransFix™, se logra llevar a cabo la identificación de cada línea celular teniendo en cuenta éstos parámetros.
4. Se recomienda el uso de TransFix™ en muestras de M.O hasta un periodo de 48 horas y mantenidas a temperatura ambiente, solo para sitios muy distantes.
5. Para el análisis morfológico en muestras de M.O anticoaguladas con EDTA se recomienda realizar el extendido en un periodo máximo de 24 horas después de la obtención de la muestra.
6. No se recomienda el uso del TransFix™ para realizar análisis morfológico, ni en muestras no estabilizadas en periodos superiores a 24 horas.
7. Estas recomendaciones podrán ser implementadas en el servicio de citometría del HUSI y otras instituciones para el envío y recepción de muestras de M.O de sitios distantes.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Quijano S, López A, Sancho J, Panizo C, Debén G, Castilla C, García-Vela J, Salar A, Alonso-Vence N, González-Barca E, Peñalver F, Plaza-Villa J, Morado M, García-Marco J, Arias J, Briones J, Ferrer S, Capote J, Nicolás C, Orfao A. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 1462-1469
2. Warrino D, DeGennaro L, Hanson M, Swindells S, Pirruccello S, Ryan W. Stabilization of White blood cells and immunologic markers for extended analysis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2005; 305: 107-119
3. Van Lochem E, Van der Velden V, Wind H, te Marvelde J, Westerdaal N, van Dongen J. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B* 2004; 60B: 1-13
4. Jani I, Janossy G, Iqbal A, Mhalu F, Lyamuya E, Biberfeld G, Glencross D, Scott L, Reilly J, Granger V, Barnett D. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. *Journal of Immunological Methods* 2001; 257: 145-154
5. Bergeron M, Shafaie A, Ding T, Phaneuf S, Soucy N, Mandy F, Bradley J, Fahey J. Evaluation of Stabilized Blood Cell Products as Candidate Preparations for Quality Assessment Programs for CD4 T-Cell Counting. *Clinical Cytometry* 2002; 50: 86-91
6. Orfao A, Ortuno F, De Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry A* 2004; 58: 62-71.

7. Orfao A, González de Buitrago J. La Citometría de Flujo en el Laboratorio clínico. Sociedad. Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Universidad de Salamanca. 1995. Páginas: 13, 31.
8. 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. *Biomédica* 2010; 30(Supl): 11-21.
9. Ruiz-Argüelles A, Duque R, Orfao A. Report of the first Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Cytometry* 1998; 34: 39-42
10. Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque R, Orfao A. Report on the Second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. *Cytometry Part B* 2005; 70B: 39-44
11. Barrera L, Drago M, Zamora A, Gómez F, Sainz T, Mendoza F. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2004; 17: 42-55
12. Welsch U. 2010. *Histología*. Editorial Panamericana. 2ª Edición. Madrid, España. Página: 225
13. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología* 2007; 2: 95-107

14. Roa D, Fiorentino S, Rodríguez V, Campos A, Infante E, Cardozo C, Quijano S. Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Universitas Scientiarum* 2010; 15: 206-223
15. Canonico N, Xamai L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, Felici C, Falcieri E, Reilly J, Barnett D, Papa S. Evaluation of leucocyte stabilization in TransFix®-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Journal of Immunological Methods* 2004; 295: 67-78
16. 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.
17. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
18. Bikoue A, Janossy G, Barnett D. Stabilised cellular immune-fluorescence assay: CD45 expression as a calibration standard for human leukocytes. *Journal of Immunological Methods* 2002; 26: 19-32
19. Plate M, Louzao R, Steele P, Greengrass V, Morris L, Lewis J, Barnett D, Warrino D, Hearps A, Denny T, Crowe S. Evaluation of the Blood Stabilizers TransFix™ and Cyto-Chex® BCT for Low-Cost CD4 T-Cell Methodologies. *Viral Immunology* 2009; 22: 329-332
20. Nuckel H, Novotny J, Noppeney R, Savidou I, Dührsen U. Detection of Malignant Haematopoietic Cells in the Cerebrospinal Fluid by Conventional Cytology and Flow Cytometry. *Clinical & Laboratory Haematology* 2006; 28: 22-29

21. Contreras S. 2010. Utilidad Diagnóstica de la Citometría de Flujo en el Análisis de Muestras de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en Pacientes con Linfomas B Agresivos. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 29 páginas.
22. Subirá D, Castañon S, Aceituno E, Hernández J, Jiménez-Garófano C, Jiménez A, Jiménez A, Román A, Orfao A. Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples and Its Usefulness in Routine Clinical Practice. *American Journal of Clinical Pathology* 2002; 117: 952-958
23. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, Quijano S, Stetler-Stevenson M, Subira D, Wyndham Wilson. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry* 2008; 45: 6.25.1-6.25.16
24. Canonico B, Betti M, Luchetti F, Battistelli M, Falcieri E, Ferri P, Zamai L, Barnett D, Papa S. Flow Cytometric Profiles, Biomolecular and Morphological Aspects of Transfixed Leukocytes and Red Cells. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2010; 78B (4): 267-278.
25. Miranda M, Dyer K, Grandis J, Johnson D. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X_L and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia* 2003; 17: 390-400.