



Comparación de dos métodos para el procesamiento e inmunotipificación de muestras hemáticas por citometría de flujo

Jéssica Aneth Vergara Hernández¹, Marco Aurelio Pardo Galván¹, Sergio Gutiérrez Castellanos² y Ana Edith Higareda Mendoza¹

1 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2 Instituto Mexicano del Seguro Social. anilude20@gmail.com

La inmunotipificación es una técnica que involucra el marcaje celular con anticuerpos unidos a un fluorocromo y la detección de éstos por citometría de flujo. Esta técnica permite analizar muestras heterogéneas y caracterizar a las subpoblaciones celulares, lo cual es de vital importancia en la clínica ya que permite establecer un diagnóstico diferencial, como en el caso de las leucemias en donde el reconocimiento del origen celular afectado (linfocitos B o T) sólo es posible por este medio. Para la buena interpretación de resultados es muy importante el procesamiento de la muestra, que implica pasos como la lisis eritrocitaria, el marcaje con anticuerpos de superficie, la fijación y permeabilización celular y el marcaje de los componentes intracelulares. En el presente trabajo se evaluó la efectividad del procesamiento de sangre periférica de voluntarios sanos utilizando dos métodos. En el primero se utilizó y siguió el protocolo descrito por un kit comercial y en el segundo un protocolo diseñado a partir de un análisis de diversos reportes bibliográficos. Se evaluó la eficiencia en la separación de poblaciones celulares, el éxito en la inmunotipificación y la pérdida celular. Con base en los datos de la biometría hemática de cada muestra, se tomó un volumen correspondiente a 500,000 leucocitos por muestra, que consistieron en muestras con anticuerpos y controles a los cuales se les adicionó PBS en lugar de los anticuerpos. Se utilizó un control y una muestra para cada método. Se utilizaron anti-TdT-FITC y anti-laminina-PECy5.5 como anticuerpos dirigidos a componentes intracelulares, y como de superficie anti-CD45-ECD y anti-CD22-PE. Se realizó una tinción con DAPI-RNAsa para establecer las distintas fases del ciclo celular. Los datos fueron adquiridos en un citómetro Cytoflex de Beckman Coulter. Se seleccionaron las poblaciones celulares y los puntos de corte, para cada fluorocromo, en base a los controles de cada método. Las muestras procesadas con el "kit" presentaron mayor pérdida celular durante el procesamiento. Adicionalmente, el análisis por citometría de flujo arrojó una mayor dispersión en las poblaciones celulares dificultando la correcta identificación y separación de la población leucocitaria. Con el protocolo diseñado se logró una buena distribución poblacional y la distinción de subpoblaciones celulares por inmunotipificación siendo posible la detección y cuantificación de moléculas intracelulares específicas y de interés, como aquellas que permiten la identificación de las distintas fases del ciclo celular, dato que posee relevancia clínica. Se concluye que el protocolo diseñado en el laboratorio presenta menor pérdida celular, conserva mejor la integridad celular y se inmunotipifican con mayor eficiencia las poblaciones hematológicas, esto en comparación a los resultados obtenidos con el "kit" de referencia, obteniendo en forma global mejores resultados en la detección de antígenos celulares superficiales e intracelulares.