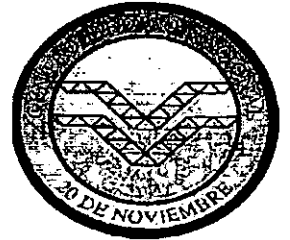




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTA DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**VALORES DE REFERENCIA DE
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS
CD4 Y CD8 POR CITOMETRIA DE FLUJO**

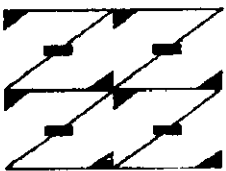
297481

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

ILDEFONSO FILEMON LOZADA MEDINA



**LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

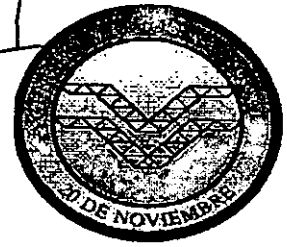
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



41



NOMBRE: LOZADA MEDINA ILDEFONSO FILEMÓN

NÚMERO DE CUENTA: 9453556-1

FOLIO: 26418

AÑO DE TERMINACIÓN DE LA CARRERA: 1998.

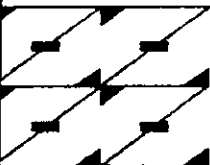
ORIENTACIÓN : BIOQUIMICA CLÍNICA.

TÍTULO DEL PROYECTO: VALORES DE REFERENCIA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS CD4 Y CD8 POR CITOMETRIA DE FLUJO

AREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO: INMUNOLOGÍA

NOMBRE DEL DIRECTOR: Q.F.B. ROSA ALICIA ESCALANTE MANZANILLA.

NOMBRE DEL ASESOR : Q.F.B. MA. DEL PILAR CEDILLO MARTÍNEZ.



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO: LABORATORIO DE PRUEBAS ESPECIALES; HISTOCOMPATIBILIDAD DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**A mis Padres (Ildefonso y Domitila)
por todo el apoyo y comprensión que
me han brindado para poder llevar a
terminó este gran proyecto de mi vida,
a mis dos viejos gracias por todo y por
lo principal por la vida y el cariño que
me han dado.**

Deseo agradecer su valiosa participación en la realización de este trabajo a la Q.F.B. Ma. de Lourdes Jiménez Perea; Química del Laboratorio de perinatología. C.M.N. "20 de NOV."

Deseo agradecer las facilidades proporcionadas para la terminación de esta tesis al Dr. Fernando Escovedo Aguirre; Jefe de Medicina Materno Fetal. C.M.N. "20 de NOV."

De forma especial deseo hacer un reconocimiento y agradecimiento a la Q.F.B. Ma. de Lourdes Díaz Contreras (q.p.d.) por el apoyo en la realización de este trabajo.

Mi más amplio reconocimiento a todas las personas que me ayudaron para la realización de mis estudios, y en especial a mi director de tesis Q.F.B. Rosa Alicia Escalante Manzanilla así como a mi asesor Q.F.B. Ma. del Pilar Cedillo Martínez.

ÍNDICE

Introducción

Citometría de flujo.	1
* Antecedentes históricos de la citometría de flujo.	
* Aspectos técnicos de la citometría de flujo.	
* Sistema electrónico.	
* Presentación de resultados en citometría de flujo.	
* Sistemas de cómputo en citometría de flujo.	
Formación de linfocitos.	8
* Fisiología del sistema vascular.	
* Formación de sangre intrauterina.	
* Formación de sangre fase hepática.	
* Formación de sangre fase mieloide.	
* Formación de sangre extrauterina.	
* Principios de la maduración celular normal.	
* Transformación.	
* Maduración de leucocitos.	
Órganos linfoides primarios.	12
* Timo.	
Órganos linfoides secundarios.	13
* Sistema linfático y ganglios linfáticos.	
* Bazo.	
Otros órganos periféricos.	16
Linfocitos.	16
Aplicaciones de la citometría de flujo.	25
Bioseguridad para citometría de flujo.	29
Planteamiento del problema.	31
Objetivos.	32

Hipótesis de trabajo.	33
Material.	34
Método.	35
* Procedimiento	
Diagrama de flujo.	43
Resultados.	44
Discusión de resultados.	65
Conclusiones.	67
Recomendaciones.	68
Anexo I (Preparación y conservación de reactivos)	69
Anexo II (Presentación de resultados en citometría de flujo para el laboratorio de histocompatibilidad.	87
Bibliografía.	95

INTRODUCCIÓN

“La sangre es vida”, es parte de nuestro pensamiento mágico-religioso. La sangre ocupa un lugar muy especial en la cultura de todos los pueblos, vigentes y desaparecidos, es parte de la historia misma de la humanidad. La sangre se ha ofrecido, se ha bebido, tirado, bañado, reemplazado, estudiado y transfundido. Representa lo que el pensamiento y cultura de cada individuo o sociedad desea; simbolismo, misticismo, colorido, miedo, misterio, terror, sadismo o esperanza de vida, dolor, tristeza, amargura, amor, racismo, movimiento, drama y la riqueza misma.

Los avances cinéticos-tecnológicos del siglo XX, han colocado a la inmunología en una ciencia sin límites, pues debido a la combinación de las técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo (C.F.) proveen de una poderosa herramienta para el diagnóstico clínico. Aunque en la actualidad la C.F. se considera como tecnología de moda, ésta tuvo su advenimiento desde 1940, cuando Coons midió la fluorescencia del antraceno unido a una molécula de un anticuerpo. En la actualidad la C.F. involucra la medición de los cambios de resistencia eléctrica causados por los objetos de estudio o la refracción de la luz. En concreto la citometría de flujo se refiere a la medición de las características morfológicas de células u otras partículas biológicas. Es un proceso en el cual las mediciones son hechas cuando las partículas pasan en línea en una corriente líquida a través de un rayo láser.(1,8)

Un avance que se da aún más es el surgimiento de los anticuerpos monoclonales. La introducción del rayo láser y las computadoras a la C.F. permitió que su utilización en biología celular sea ilimitada. Específicamente en el área de histocompatibilidad, hubo un gran incremento en el número de aplicaciones para la C.F. en ello se incluye el monitoreo inmunológico en pacientes transplantados y en la prueba cruzada por C.F..

Los linfocitos son derivados procedentes de células madres pluripotenciales, siguiendo un ordenado proceso de diferenciación celular generalmente para formar células B maduras o células T con funciones críticas en el sistema inmune del huésped. Las células B producen anticuerpos (Ac), actúan como presentadores de antígenos (Ag) y liberan de citoquinas. Mientras que la función de la célula T es como regulador celular (cooperadora/reguladoras) y células efectoras (células citotóxicas) así también liberan una gran cantidad de citoquinas. Una tercera población de linfocitos, referidos como células asesinas naturales (NK) funcionan como células citotóxicas y siguen en forma separada pero bajo una evolución definida. La interacción de los linfocitos con Ag solubles extraños o péptidos antigénicos encontrados sobre otras células constituyen el punto focal de la respuesta inmune. Es un proceso complicado que involucra la adhesión de células seguidas por un reconocimiento antigénico y finalmente activación celular.

La evaluación de los linfocitos tanto de sangre periférica como de tejidos tiene un fin común como método de laboratorio para asignar linajes en leucemias, linfomas y en el pronóstico de infecciones como la de inmunodeficiencia humana (ej. HIV), y la evaluación del potencial de la deficiencia inmunológica.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

El antecedente histórico más remoto corresponde a Lomonosov quien en 1742 inventó un sistema de flujo para medir partículas de hidrosoles y aerosoles. lo que se denominó después efecto Tyndall, anticipándose al microscopio de campo oscuro y a la medición de

partículas submicroscópicas por dispersión de un haz de luz. En el siglo XX, en la década de los años 30, Moldovan describe intentos, sin éxito, de contar células que circulaban a través de un tubo capilar. Al parecer se ha dicho que los equipos de medición para especímenes biológicos descienden de aparatos para contar polvo en minas. El contador de partículas de Gucker, utilizado en la II Guerra Mundial y en la Escuela de Medicina de Harvard para la medición de bacterias y esporas del medio ambiente, trabajaba con una de las más potentes fuentes de luz que se conocía; el faro de un automóvil Ford. Siguiendo a Gucker, el principio del sistema de corriente de fluidos fue adoptado por Crosland-Taylor y varias industrias en el desarrollo de aparatos para contar células sanguíneas. El sistema Coulter está basado en que la conductividad eléctrica de las células que pasan por un orificio pequeño, es más baja que la de las soluciones salinas usadas como diluyente y esto puede detectarse por el cambio de la impedancia eléctrica en el orificio al momento de pasar.(8)

El primer orificio que hizo Coulter, fue hecho en papel celofán de una envoltura de cigarrillos.(8)

La diferenciación entre glóbulos rojos y leucocitos fue hecha por Kosenov con el uso de naranja de acridina. Los pulsos de marcaje al comparar un glóbulo rojo que no se teñía con los leucocitos, permitió una clara diferencia. Los aparatos que precedieron a los modernos equipos de citometría de flujo, fueron los de Kamenstsky quien midió el contenido de los ácidos nucleicos y el tamaño celular por esparcimiento del haz de luz, y el seleccionador celular de Fulwyler que utilizó el principio del impresor de tinta de chorro. Se han agregado sensores ópticos y electrónicos a los primeros equipos de citometría. Los modernos citómetros de flujo para investigación aparecieron en los años 70 y utilizaron helio, neón y argón como fuentes de luz. En 1972 el grupo de Herzenberg en Stanford desarrolló una versión mejorada de su seleccionador celular. Fue el primer equipo que pudo detectar señales fluorescentes de células que habían sido marcadas con anticuerpos conjugados a fluoresceína y rodamina.(8)

ASPECTOS TÉCNICOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO (C.F.)

En la última década la C.F. se ha convertido en una potente herramienta para el análisis de células sanguíneas. En la clínica, la metodología se divide en técnicas de investigación y de rutina. Esta últimas son la inmunofenotipificación de linfocitos, la cuantificación de DNA y el recuento de reticulocitos. Estos procedimientos proporcionan una información muy valiosa tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los cambios ocurridos en el sistema inmune del sujeto HIV+.(8)

El citómetro de flujo analiza poblaciones celulares en un tiempo muy corto, de 1000 a 10000 células por segundo en promedio. Puede proporcionar la distribución de diversos parámetros.(8)

La C.F. es un técnica que permite la medición simultánea de varias características en una sola célula, por ejemplo tamaño, granularidad y fluorescencia. Para esto el equipo de citometría utiliza sistemas ópticos, de fluidos y electrónicos. Los datos sobre estas características celulares son analizados posteriormente por medio de los sistemas de cómputo. Para analizar los linfocitos en el equipo de CF, las células deben estar en suspensión y se hacen pasar por un sistema diseñado de tal manera que se logra un flujo laminar en un enfoque hidrodinámico. Las células se localizan en el centro de fluido y así interactúan con un rayo láser, modulado por una serie de lentes. El láser tiene su origen en una fuente incandescente de argón. Cuando el rayo láser encuentra presente alguna molécula fluorescente, está es excitada y la luz dispersada y la luz fluorescente son colectadas por lentes colocados en posiciones adecuadas. Una combinación de filtros y lentes dirigen las luces dispersada y fluorescente a los detectores. Los detectores producen una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz que incide sobre ellos. Los datos generados son recolectados para cada una de las partículas o eventos y las características o parámetros que se miden para cada uno de ellos se basan en sus propiedades de dispersión de la luz y fluorescencia. Los datos recolectados se guardan en la computadora donde pueden analizarse para dar información acerca de las subpoblaciones celulares de la muestra sanguínea.(1,8)

Sistema de fluidos. Los constituyentes de un sistema de fluidos en el citómetro se usan para colocar las partículas de la muestra en el centro del rayo láser. Para lograr esto, la suspensión concentrada de partículas se coloca en una solución llamada líquido de envoltura, el cual va a rodear a la suspensión celular. El compartimento del flujo celular, por donde circulan las células, está diseñado de tal manera que el flujo laminar sea estable. Esto significa que la corriente de la muestra permanece separada, pero en posición coaxial dentro del líquido de envoltura. El flujo de este líquido se acelera y atenúa la suspensión, causando que las partículas se localicen en el centro del fluido en un proceso llamado enfoque hidrodinámico (hydrodynamic focusing) (8).

Sistema óptico láser son las siglas de light amplification by stimulated emission of radiation (amplificación de la luz por emisión estimulada de la radiación). El rayo láser producido por el argón y por la lámpara de mercurio son los tipos de fuentes luminosas más ampliamente usadas en C.F.. La ventaja del rayo láser es su estabilidad y la capacidad de enfocar al tamaño de la célula.(8)

La dispersión de la luz se presenta cuando una partícula refleja la luz que incide sobre ella. La magnitud a la cual esto ocurre, depende de las propiedades intrínsecas de la partícula, principalmente su tamaño y densidad. Los componentes de una célula que contribuyen a la dispersión de la luz son: la membrana, el núcleo y el material granular interno de la célula. La forma de la célula y la topografía de su superficie (rugosidad, lisura) también contribuyen en este proceso. La luz dispersada en la misma dirección del rayo láser se llama luz dispersada hacia el frente (FSC, de forward light scatter), la cual proporciona el área de superficie celular y detecta en la misma dirección en la que viaja el rayo láser incidente. La señal FCS es generalmente fuerte y fácilmente detectable por un fotodiodo simple. La buena resolución de la señal FCS requiere que las partículas estén bien localizadas en el centro del flujo de la muestra y que el punto focal del rayo láser esté localizado en la parte central del flujo.(8)

Una segunda señal de la dispersación de la luz se recolecta a 90° con respecto al rayo láser. A ésta se le conoce como luz dispersada hacia los lados (SSC, de side scattered lighth). La señal SSC varía en proporción a la estructura interna y la granularidad de la partícula. Un conjunto de lentes localizados a 90° del rayo láser intercepta y enfoca la luz, la cual es dispersada y dirigida hacia detectores adecuados.(8)

La correlación de las señales FCS y SSC permite la discriminación de los diferentes tipos celulares dentro de una población celular heterogénea, sirviendo para identificar las principales subpoblaciones de leucocitos en la sangre humana. Con la señal de FSC sólo pueden discriminarse los diferentes tipos celulares, sin embargo, para lograr una mayor resolución se usan ambas señales.(8)

En la C.F. se emplean anticuerpos monoclonales conjugados a compuestos fluorescentes. Los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa dentro de límites de longitud de onda que son característicos para cada uno de los compuestos. Esta absorción causa que un electrón suba a un nivel mayor de energía. Este electrón regresa a su estado basal emitiendo en diferente longitud de onda un fotón como una liberación del exceso de energía. El límite dentro del cual un compuesto fluorescente puede ser excitado, es conocido como espectro de absorción. Debido a que se consume mayor energía en la transición de absorción que en la de emisión de la fluorescencia, las longitudes de onda emitidas serán más grandes que la de absorción. Estas longitudes de onda emitidas forman el espectro de emisión. La señal fluorescente generada debe ser proporcional a la cantidad de colorante que está presente sobre la partícula. Esto requiere que para un colorante dado se use una longitud de onda de excitación adecuada. También se necesita que se usen fluorocromos diferentes, se seleccionen cuidadosamente de tal manera que la fluorescencia de una puede ser discriminada de la de los otros. Los equipos los agrupan en canales de fluorescencia, F1, F2 y F3. Si el rayo láser como fuente luminosa es originado en argón, deben elegirse fluorocromos que sean excitados a 488 nm. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el fluorocromo más comúnmente empleado, cuyo máximo de absorción está cerca de los 488 nm..(8)

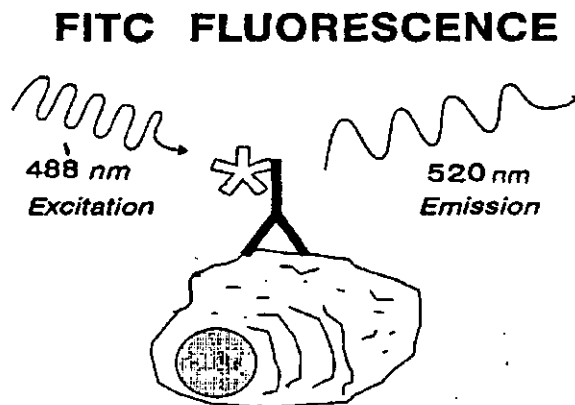


FIG. No. 1 ESPECTRO DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN DEL FLUOROCROMO FITC

Puede usarse simultáneamente más de un fluorocromo, si cada uno puede excitarse a 488nm y si las longitudes de los picos de emisión no están muy cercanas, por ejemplo la combinación de FICT y ficoeritrina (PE) cumple con esta condición ya que el espectro de emisión para el FICT y la PE están lo suficientemente separadas para poder detectarse. Esto permite utilizar dos marcadores en la misma célula.(8)

Para detectar las señales de fluorescencia en el citómetro, se emplean tubos fotomultiplicadores (PTM), los que responden a una amplia gamma de longitudes de onda. La capacidad para detectar las señales luminosas requiere de detectores que sean sensibles a la luz. En el citómetro de flujo se usan fotodiodos para detectar las señales FCS y tubos fotomultiplicadores sensibles para detectar las señales SSC y de fluorescencia. Los tubos fotomultiplicadores detectan y amplifican señales débiles de luz. Un PMT responsable de la detección de una señal de fluorescencia debe detectar solamente la luz asociada con el colorante fluorescente. La especificidad de un detector para cada uno de los colorantes puede hacerse óptima colocando un filtro enfrente de cada PMT, el cual permite el paso de una banda reducida del espectro cercano al pico de emisión del colorante. Un lente que separa el haz es responsable de dirigir las diferentes luces hacia dos direcciones distintas. Los fotones con longitud de onda mayor de 560 nm se dirigen hacia el tubo fotomultiplicador FL2 mientras que se transmite la luz de longitud de onda más corta hacia el tubo fotomultiplicador FL1.(8)

SISTEMA ELECTRÓNICO.

Una vez que las señales luminosas son detectadas, se convierten a pulsos electrónicos proporcionales a la intensidad de la luz incidente, los cuales son analizados y después convertidos a señales digitales que se guardan en la computadora como información de datos.

Los perfiles de intensidad se representan como histogramas, en donde el eje horizontal representa la población de eventos que tiene más fluorescencia. Se cuantifica en canales de fluorescencia y está colocada en forma lineal en una escala de 0-250 canales (dependiendo de tipo de equipo) y en forma logarítmica de 10^0 hasta 10^4 . Cada evento se coloca en el canal que corresponde a su intensidad. Las señales con intensidad idéntica se acumulan en el mismo canal. Los eventos con señales con mayor fluorescencia se colocarán en canales que se encuentren hacia la derecha, aquellos con señales menores se colocarán en canales colocados hacia la izquierda.(9)

Esto permite la distribución de los valores en una población en donde se puede encontrar una mediana. El eje vertical se toma en forma arbitraria de acuerdo al tamaño de la población. Algunos sistemas de cómputo lo hacen automáticamente. También es posible graficar la información como una correlación de dos parámetros que se muestran simultáneamente, una sobre el eje de la X y el otro en el eje de las Y.

En algunos citómetros se pueden detectar cinco parámetros. Dos son los parámetros de dispersión de la luz y los otros son los parámetros de fluorescencia FL1, FL2 Y FL3. En investigación, cualquiera de estas posibles combinaciones puede usarse para establecer una puerta lo que permite seleccionar una cierta subpoblación en una mezcla de diferentes tipos celulares o bacterianos. Se define o establece una ventana. Los datos obtenidos pueden ser solamente los incluidos en la puerta o todos simultáneamente y esto permite valorar algunas subpoblaciones celulares y comparar su proporción con el resto.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los datos o la información que el citómetro produce pueden presentarse en cuatro diferentes formatos: histogramas de frecuencia (side by side), diagrama de puntos (dot-plot), diagrama de contornos (contour plot) y diagrama tridimensional (isometric). Cada método tiene su utilidad propia, se selecciona a criterio del operador dependiendo de cómo quiera presentar los datos o hacer resaltar alguna información en particular.(9)

Histograma de frecuencia (side by side, FIG. No.2). Es el más empleado en investigación. En el histograma se van colocando cada uno de los eventos en rangos o canales, en el eje de las X dependiendo de la intensidad de la característica de muestra sanguínea que se está evaluando. Cercano al origen en lado izquierdo; se colocan los eventos que tienen una menor intensidad de fluorescencia y hacia la derecha de la pantalla los de mayor intensidad. Los eventos restantes se colocan en forma acumulativa, de acuerdo al número seleccionado previamente, de manera que se vaya integrando el histograma. Si la población es uniforme en fluorescencia, la base del histograma será estrecha, si no es uniforme será más amplia, además si hay varias poblaciones se apreciarán varios histogramas.(9)

Diagramas de puntos (dot plot FIG. No. 3). Este tipo de diagramas es el más comúnmente utilizado en el trabajo de rutina y es la forma en que se presenta al paciente. De acuerdo al número de eventos por valorar se puede seleccionar un punto en la pantalla por cada 10 o 100 eventos por registrar. Si tienen las mismas características se reunirán en una zona produciendo una mancha con otros puntos alrededor y en las zonas donde hay menor número de eventos se apreciarán puntos aislados. En este tipo de diagrama se pueden valorar dos características en forma simultánea y se pueden combinar los cinco parámetros mencionados, FSC, SSC, FL1, FL2 Y FL3. Normalmente se hacen combinaciones de dos en dos por ventana. Incluso, en la pantalla del monitor se pueden poner varias ventanas y analizarlas al mismo tiempo. Se puede por ejemplo, valorar el tamaño de las células con su fluorescencia (FCS Y FL1). Con la aparición en el mercado de los llamados marcadores simultáneos para FL1, FL2 Y FL3 v.gr. FL1; FITC, FL2; PE y FL3 TR (Texas Red) hay otras modificaciones. En algunos instrumentos se puede aumentar la combinación y el poder de análisis simultáneo con dos o tres rayos láser.(9)

Contornos (contour plot FIG. No. 4). En este tipo de diagramas se observan líneas sinuosas en forma de contornos que definen la agrupación de la población. Este patrón también puede definir las áreas de dos o más tipos de células. Este diagrama es similar a la imagen de un mapa de contornos, en donde hay una similitud con una representación bidimensional de una colina o montaña vista desde un avión. Las cimas son definidas como anillos concéntricos de elevación aumentada, en el caso de las células, esto se traduce como un aumento en determinada región.(9)

Tridimensional (isometric FIG. No 4). Este tipo de presentación aunque es más elegante, no es utilizado para exhibir datos en la clínica y es poco empleado en investigación. También es una forma de interrelacionar varios parámetros y es más fácil de interpretar ya que los diversos grupos celulares muestran diferentes cimas.(9)



FIG. No. 2 HISTOGRAMA DE FRECUENCIA (side by side)

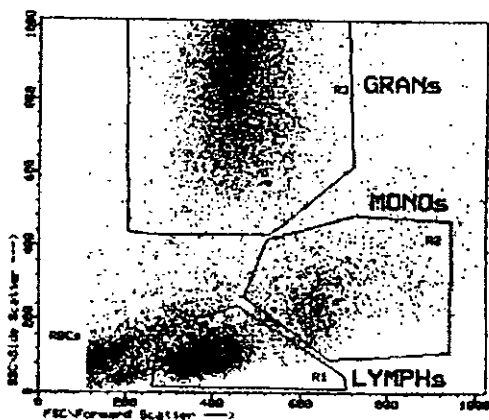


FIG. No.3 DIAGRAMA DE PUNTOS (dot plot)

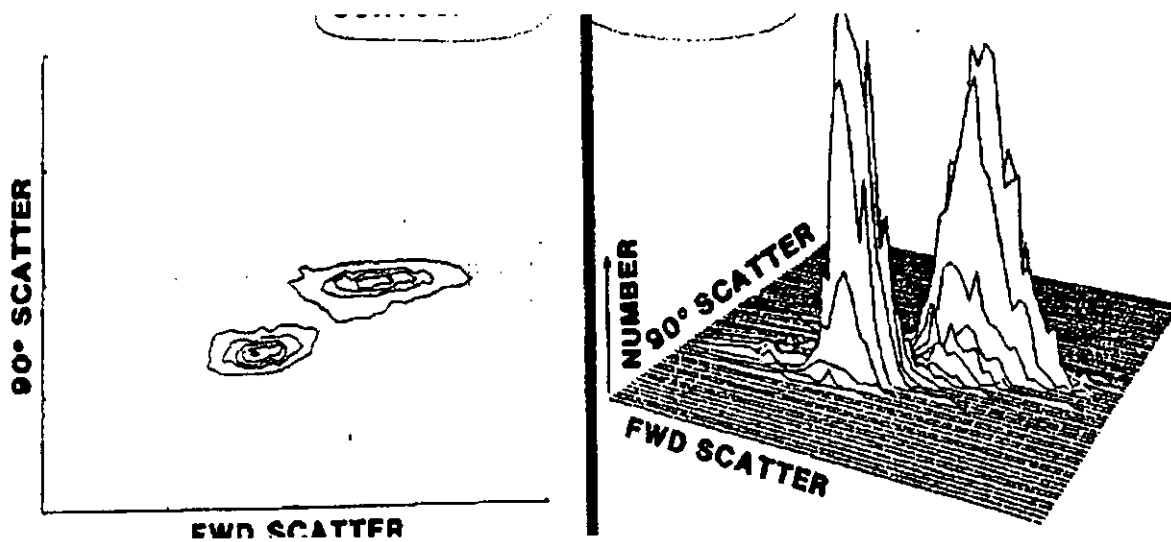


FIG. No. 4 DIAGRAMA DE CONTORNOS (IZQ.) Y TRIDIMENSIONAL (DER.).

SISTEMAS DE CÓMPUTO (SOFTWARE).

Existen diferentes paquetes de computación o softwares que permiten el análisis de datos y la calibración del equipo con la finalidad de obtener resultados objetivos y reproducibles, que ayuden al diagnóstico del estado inmunológico del paciente.(9)

Hay determinados criterios embriologicomorfológicos, datos fisiopatológicos y técnicas diagnósticas de laboratorio relativos a la sangre, sin cuyo conocimiento hematológico no sería posible el estudio clínico completo de cualquier paciente.

Con simplicidad, la sangre es un líquido rojo único, claro (arterial) u oscuro (venoso), de composición variable, que circula a través de los vasos sanguíneos del organismo, con volumen total aproximado de 30 ml/Kg. de peso. Participa en las actividades fisiológicas y patológicas de todos los órganos y está compuesta de un líquido llamado plasma en el que están suspendidos los eritrocitos (células hemáticas rojas), los leucocitos (células hemáticas blancas) y trombocitos (plaquetas), denominados en conjunto hematocitos. Estos elementos de la sangre desempeñan distintas funciones. Los eritrocitos están íntimamente asociados con el flujo cardiaco, las actividades pulmonar y renal, y la respuesta de los vasos sanguíneos con el fin de oxigenar los tejidos corporales. Los leucocitos participan en la fagocitosis, para lo cual utilizan los granulocitos y monocitos junto con factores plasmáticos coexistentes. Los linfocitos y sus sucesores, las células plasmáticas, se encargan de elaborar las fracciones gammaglobulínicas, íntimamente asociadas con la formación de anticuerpos y con alteraciones tisulares. Los eosinófilos y basófilos participan en los fenómenos de hipersensibilidad. Las plaquetas son iniciadoras y corresponsales del proceso de coagulación. (15)

FISIOLOGÍA DEL SISTEMA VASCULAR.

A fin de comprender el significado de las variaciones cualitativas y cuantitativas de la medula ósea y la sangre periférica, resulta adecuado efectuar una breve revisión de la fisiología de la sangre y de los órganos de la hematopoyéticos. (15)

FORMACIÓN DE SANGRE INTRAUTERINA.

El mesénquima o tejido conectivo primordial del embrión es la primera fuente de desarrollo sanguíneo, con tres fases dinámicas íntimamente ligadas entre sí. En el embrión humano, la fase mesoblástica o megaloblástica se inicia, a veces, durante los dos primeros meses (probablemente ya en el tercer día) en el saco vitelino, especialmente en los islotes hemáticos del área vasculosa. La parte mesodérmica de esta área forma una estructura tubular compuesta de dos capas: una externa que constituye las células hemáticas primitivas (hemocitoblastos o hemohicioblastos) que poseen un gran núcleo con red de cromatina vesicular y un delgado borde de citoplasma. (15)

El megaloblasto de Ehrlich, formado a partir del hemocitoblasto, se introduce en la luz de los vasos sanguíneos y, gradualmente, llega a hemoglobinizarse (hemoglobina embrionaria $\alpha \delta$) a partir de las sustancias precursoras tipo porfirina que contiene su citoplasma; posteriormente se transforma en una célula hemática roja nucleada primitiva. Estas células rojas nucleadas más pequeñas contienen más hemoglobina (ejemplo de ellas son el pronormoblasto, normoblasto basofílico y otras). El eritrocito maduro se produce finalmente mediante un proceso de eritropoyesis normoblástica que se caracteriza por la pérdida del núcleo. Los procesos anteriores duran hasta las nueve semanas de la vida embrionaria; mientras tanto se inicia la fase hepática de formación sanguínea. (15)

FORMACIÓN DE SANGRE FASE HEPÁTICA.

Comienza en apariencia intravascularmente en el hígado entre la sexta o novena semana embrionaria con focos de normoblastos basófilos que se producen a partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas, las cuales se diferencian de las células hepáticas, hasta el quinto mes. El bazo y el timo también participan en estos procesos intravasculares. Las células leucocíticas granulares comienzan a surgir extravascularmente a partir del mesodermo, comenzando en el cuarto mes y emigrando a través de las paredes capilares para hacerse intravasculares. Hasta el quinto mes embrionario se produce relativamente pocas células sanguíneas de la serie blanca. Las células de la serie linfocítica se producen en el bazo, ganglios linfáticos y timo. El bazo sirve especialmente como órgano de reserva de la médula ósea, en especial porque su microcirculación parece estar bien acondicionada para la formación de las células sanguíneas. Las células de las series eritrocítica (conteniendo cadenas polipeptídicas de hemoglobina fetal $\alpha \gamma$) y granulocítica se continúan formando intrahepáticamente, aunque cada vez en menores cantidades, hasta el nacimiento.(15)

FORMACIÓN DE SANGRE FASE MIELOIDE.

Esta se inicia en el quinto mes de la vida intrauterina, simultáneamente con el desarrollo de las cavidades óseas, primero se forman los leucocitos granulares, seguidos de las células de tipo eritrocítico. Mientras tanto, no hay prácticamente hematopoyesis a partir de las células hepáticas mesenquimatosas. Estas células, junto con otras células del sistema reticuloendotelial. Las células del revestimiento (macrófago, clasmotocito, hemohistioblasto) adquieren nuevas funciones y se hallan en ocasiones en la corriente sanguínea con un aspecto similar al de grandes monocitos.(15)

FORMACIÓN DE SANGRE EXTRAUTERINA.

TEJIDO MIELOIDE. Aunque todavía existe una cierta hematopoyesis hepática y esplénica hasta el decimoquinto día de la vida extrauterina, en el nacimiento la médula ósea ya ha desarrollado completamente la producción de células eritrocíticas y leucocíticas granulares. En el nacimiento, todas las estructuras esqueléticas fetales contienen médula ósea y continúan en este estado hasta los dos o tres años de edad.(15)

SISTEMA RETICULOENDOTELIAL.

Debido a la falta de médula ósea grasa de reserva relativamente poco o nada funcionante, cualquier necesidad (crisis repentinas tales como una hemorragia u otras enfermedades) de formación sanguínea que surja hasta los dos o tres años de edad origina una hematopoyesis extramedular por parte de las células reticuloendoteliales del hígado, bazo y, en ocasiones, de los tejidos renal y adiposo retroperitoneal. La mayoría de los investigadores creen que las células reticuloendoteliales son las precursoras de todos los elementos formes de la sangre, es decir, que por división y maduración dan lugar a las primeras células sanguíneas identificables con un núcleo primitivo y un protoplasma basófilo. Estas son algunas de las células diferenciadas de la serie eritroide y mieloide de la circulación sanguínea. Sin embargo, es materia de controversia el lugar específico de origen (intravascular o extravascular) y el estadio en el cual la diferenciación de las primeras células se hace lo suficientemente permanente como para dar lugar sólo a un tipo específico de células.(15)

Rappaport ha propuesto una derivación de las células a partir del sistema reticuloendotelial.

Recientemente, algunos investigadores han postulado que cada sistema celular debe ser alimentado continuamente a partir de una fuente de células madre. Esto se ha sugerido, sobre todo, debido a que todas las células sanguíneas se pierden continuamente e irremediablemente en los tejidos o mueren en la circulación periférica, y en cambio su número permanece aparentemente constante en los individuos normales. Sin embargo, es a todas luces evidente que una célula madre funcionante en una persona normal debe tener la capacidad de autorreplicación y de diferenciación. Evidencias indirectas apuntan a la presencia en el hombre de una célula madre pluripotente para granulocitos (incluyendo monocitos), megacariocitos y eritrocitos, pero no para los linfocitos. Esta última célula puede ser la menos habitual entre las células sanguíneas maduras normales en el adulto en el cual es su propia célula madre; es decir, los linfocitos en la circulación periférica pueden dividirse y aparentemente reproducirse por sí mismo. Los conceptos modernos sugieren la existencia de una serie de compartimientos de células madre hematopoyéticas, caracterizados por el hecho de que la potencialidad de cada compartimiento subsiguiente es más restringido que el precedente. En otras palabras: cada una de las subdivisiones más inmaduras no es un ciclo generativo activo, y las células más diferenciadas se desarrollan a partir de los últimos compartimientos de células madre capaces de ser controlados directamente. (15)

La médula ósea adiposa relativamente poco activa inicia su aparición de los cinco a los siete años de edad y es evidente en la adolescencia (11 a 14 años), cuando los huesos largos comienzan a desarrollar médula ósea adiposa en sus porciones diafisarias. Este proceso aumenta gradualmente de las partes distales a las proximales de los huesos hasta que toda la médula roja (excepto en los extremos superiores del húmero y el fémur) ha sido reemplazada a la edad de 20 a 22 años. Las zonas funcionantes de médula roja, con producción de hematíes y leucocitos granulares, residen en los huesos planos del organismo, como, por ejemplo, el esternón, vértebras, costillas y el ilíaco. (15)

PRINCIPIOS DE LA MADURACIÓN CELULAR NORMAL.

Respecto a la maduración normal de las células hemáticas pueden establecerse ocho principios:

- 1) Las células blásticas no contienen gránulos.
- 2) Las células blásticas contienen un gran núcleo y una pequeña cantidad de citoplasma. Normalmente el núcleo comprende desde los $\frac{3}{4}$ a los $\frac{7}{8}$ del área celular.
- 3) A medida que las células envejecen, el citoplasma se hace menos basofílico; cuanto más azul es el citoplasma más joven es la célula. La célula plasmática constituye una excepción a esta regla.
- 4) A medida que las células envejecen, la cromatina del núcleo se hace más intensa, y cuanto más oscura es la tinción del núcleo más intenso es su contenido en cromatina.

- 5) Normalmente, cuando la célula envejece aumenta de tamaño. El megacariocito constituye la excepción.
- 6) Los nucléolos están presentes en las células jóvenes y tienden a desaparecer en las células maduras.
- 7) Hay cuatro tipos diferentes de gránulos que se ponen de manifiesto con la tinción de Wright: gránulos neutrófilos, basófilos, eosinófilos y azurófilos.
- 8) A medida que las células envejecen, los gránulos específicos se hacen menos intensos y más pequeños.(15)

TRANSFORMACIÓN

A medida que las células hemáticas se desarrollan y se distribuyen en la sangre periférica, tienen lugar las variaciones citoplásmicas y nucleares. Éstas se aprecian en el proceso síncrono y asíncrono, en la diferenciación citoplásmica, la maduración nuclear y la reducción del tamaño de la célula.(15)

El proceso sincrónico normal del desarrollo de la célula hemática es un proceso dinámico de transición en que no existe igualdad de tipo celular en las observaciones realizadas de las extensiones de sangre periférica y medula ósea de cualquier paciente. El sincronismo del desarrollo paralelo concomitante y coordinado del citoplasma y del núcleo puede estar asociado con el asincronismo o diferente relación de maduración del núcleo y del citoplasma. De esta forma, las células típicas asociadas con un desarrollo celular síncrono pueden verse en la misma extensión sanguínea junto a células atípicas o extrañas formadas como resultado de una maduración citológica sincrónica.(15)

MADURACIÓN DE LOS LEUCOCITOS

El término leucocito incluye todas las células blancas de la sangre y sus precursores de los órganos productores- células mielocíticas (granulocíticas), linfocíticas y monocíticas-. Químicamente, los leucocitos se componen de agua (82%), fosfolípidos, nucleoproteínas, glucógeno, ácido láctico, fosfatasa alcalina y otras enzimas, histamina y pequeñas cantidades de sodio, potasio, cinc, magnesio, calcio, cloro, fósforo inorgánico bicarbonato. La glucólisis en los leucocitos es fundamentalmente aerobia. Los metamielocitos y los leucocitos neutrófilos, especialmente en las infecciones, contienen grandes cantidades de glucógeno, que está disminuido en la leucemia mieloide crónica y aumentado en la policitemia vera. Los monocitos no tienen glucógeno. La fosfatasa alcalina está elevada en los neutrófilos cuando existe infección.

El núcleo y el citoplasma de los leucocitos jóvenes en crecimiento activo contienen una elevada proporción de ácidos nucleicos están unidos a las proteínas y forman las nucleoproteínas. (15)

Los leucocitos del recién nacido se originan a partir de unas células primitivas o células de la medula ósea, con cierta producción a partir de células reticuloendoteliales fijas; en el tejido linfoide y esplénico, el timo y la medula ósea.(15)

El sistema linfoide está formado por varios tipos de células:

Linfocitos, células accesorias, principalmente macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC) (en algunos casos) células epiteliales y

funcionalmente está organizado en dos tipos de órganos linfoides: órganos linfoides primarios o centrales, que proporcionan el entorno para la maduración de linfocitos (linfopoyesis), de modo que los linfocitos adquieren su repertorio de receptores específicos para cada tipo de antígeno; los linfocitos se seleccionan de modo que poseen autotolerancia (evitación de la autoinmunidad).

Los órganos linfoides primarios son: el timo, donde maduran los linfocitos T la médula ósea en el adulto como órgano de maduración de los linfocitos B.

En el feto temprano esta función la toma el hígado, aunque paulatinamente se ve sustituido por la médula. En las aves, el equivalente funcional de la médula es la Bolsa de Fabricio. (16)

Órganos linfoides secundarios o periféricos, que proporcionan el entorno para que los linfocitos interaccionen entre sí, o con las APC y otras células accesorias, y para que entren en contacto con el antígeno; diseminan la respuesta inmune al resto del cuerpo

Los órganos linfoides secundarios son: los ganglios linfáticos, que recogen Ag de los tejidos el bazo, que recoge Ag de la sangre tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT), que recogen Ag de las mucosas en la respuesta secundaria, la médula ósea actúa igualmente como órgano secundario.(16)

ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS

Timo

Es un órgano plano y blando situado en la cavidad torácica, por encima del corazón. Está formado por dos lóbulos rodeados por cápsula de tejido conjuntivo. A su vez, los lóbulos están divididos en lobulillos separados entre sí por trabéculas de tejido conjuntivo. Cada lobulillo tímico está relleno de células linfoides denominadas timocitos, dispuestas en una corteza de gran densidad celular y una médula (interior) de menor densidad celular. Desde la corteza hasta la médula existe un gradiente de diferenciación, de modo que en la corteza se encuentran los timocitos más inmaduros, mientras que en la médula se localizan los timocitos en fases madurativas más avanzadas. Tanto la corteza como la médula están rellenas de una red de células no linfoides que constituyen el estroma tímico, y que consta de varios tipos celulares: tres tipos de células epiteliales: en la corteza más externa, las células nodriza en la corteza, células corticales epiteliales en la médula, células medulares epiteliales. Células dendríticas interdigitantes sobre todo en el límite cortico-medular. Macrófagos, con una localización similar a las dendríticas. Todas estas células no linfoides del estroma expresan en sus superficies moléculas MHC de tipo I y/o II, y participan en la maduración y selección de los timocitos hacia células T maduras. En la médula tímica aparecen los denominados corpúsculos de Hassall: acúmulos concéntricos de células epiteliales. Su función es desconocida, pero su número va aumentando con la edad. En el proceso de maduración intratímica de los linfocitos, los progenitores linfoides de los linfocitos, procedentes de la médula ósea, entran en el timo y comienzan a dividirse activamente en la corteza; sin embargo, allí mueren por apoptosis más del 95% de las células generadas, que son eliminadas por los macrófagos. Los sobrevivientes van emigrando hasta la médula, donde terminan de madurar, y salen del timo como células T vírgenes maduras (inmunocompetentes), por medio de las vénulas postcapilares del timo.(16)

Durante todo este proceso los timocitos han ido interactuando con células estromales provistas de MHC en sus membranas (células nodriza a células corticales epiteliales a células dendríticas), produciéndose dos fases de selección de timocitos:

selección positiva: sólo sobreviven aquellos timocitos que hayan generado receptores TCR capaces de reconocer moléculas MHC propias; los demás mueren por apoptosis. selección negativa: se eliminan por muerte celular programada los timocitos que habiendo superado la selección positiva hayan resultado autorreactivos, es decir, los timocitos que reconozcan moléculas del propio individuo (autoantígenos) presentadas por el MHC propio, o que tengan una afinidad demasiado alta hacia el MHC propio solo.(16,17)

De esta forma sólo salen como linfocitos T maduros aquellas células autotolerantes (no inmunidad a lo propio) y capaces de reconocer antígenos (moléculas extrañas al propio individuo) en el contexto del haplotipo propio del MHC.

El timo de los mamíferos va involucionando con la edad, a partir de la pubertad.

En humanos, al nacer, el timo pesa 10-15 g, alcanza su orto en la adolescencia, época en la que llega a pesar 40-70 g, y va regresionando, de modo que en la vejez sólo pesa 3 g, aunque siempre queda un remanente de zona medular.

Por lo tanto, en la vida adulta, la producción de linfocitos T en el timo decae bastante, aunque siempre existe una actividad residual. Evidencias sobre la relación entre función tímica y respuesta inmune:

La timectomía neonatal en ratones provoca que disminuyan acentuadamente los linfocitos T circulantes, y se induce una ausencia de inmunidad específica celular.

Los ratones transgénicos noqueados ("ratones K.O.") de tipo nude ("desnudos") tienen un defecto genético que impide el desarrollo del timo. Estos ratones presentan una sintomatología similar a la descrita en el párrafo anterior.

En humanos existe una enfermedad genética conocida como síndrome de DiGeorge, en el que no se desarrolla el timo: los efectos son igualmente la carencia de linfocitos T y la ausencia de respuesta inmune celular específica.

En la fase adulta, cuando el timo ha involucionado, sigue habiendo maduración de linfocitos T en otros lugares, principalmente en el epitelio intestinal, donde se produce linfopoyesis de célula T gd y T ab, que permanecen en el epitelio intestinal o migran a la lámina propia.(17)

Sitios de desarrollo de linfocitos B: médula ósea (mamíferos) y bolsa de Fabricio (aves). La bolsa (bursa) de Fabricio es una porción especial dorsal de la cloaca, con una estructura a base de corteza y médula. La médula ósea en los adultos de los mamíferos es un equivalente "disperso" de la Bolsa de Fabricio. La porción implicada en la maduración de los linfocitos B está constituida por islas de tejido hematopoyético. Precisamente por su carácter difuso es más difícil de estudiar que la Bolsa.(17)

ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Los linfocitos maduros vírgenes que salen de los órganos linfoides primarios emigran a los órganos y tejidos linfoides periféricos: Capsulados: en ellos se produce la secreción de Ac que se distribuirán por la circulación; también se dan respuestas celulares locales, ganglios (recogen Ag de la piel y de superficies internas), bazo (recoge Ag de la sangre) Organos no capsulados asociados a mucosas (MALT): protegen del Ag que entre directamente a través de mucosas (gastrointestinal, respiratoria, genitourinaria). Su respuesta es la secreción de inmunoglobulina A secretoria (sIgA), que recubrirá la superficie mucosal (epitelial). Acúmulos más o menos difusos (no capsulados), dispersos por casi todo el cuerpo.

Sistema linfático y ganglios linfáticos.

El componente fluido de la sangre (plasma) se extravasa desde los capilares a los tejidos, generando el líquido intersticial. Parte de éste retorna a la sangre a través de las membranas capilares, pero el resto, llamado linfa, fluye desde los tejidos conectivos a una red de finos capilares linfáticos abiertos, y de allí va pasando a vasos cada vez mayores (vasos linfáticos). Finalmente, la linfa llega al mayor vaso linfático, denominado conducto torácico, que descarga a circulación sanguínea a nivel de la subclavia izquierda (cerca del corazón). (17)

De este modo se cumple una de las funciones del sistema de vasos linfáticos: capturar fluido procedente de los tejidos y reingresarlo en la sangre, asegurando niveles estables de fluido en el sistema circulatorio.

En si los ganglios linfáticos son pequeños agregados nodulares de tejido linfoide situados a lo largo de los canales linfáticos en todo el cuerpo. Los epitelios, como la piel y la mucosa de los sistemas gastrointestinales y respiratorio, así como los tejidos conectivos de la mayor parte de los órganos, tienen drenaje linfático. De este modo, el sistema linfático constituye un mecanismo de recogida de antígenos, y las células de los ganglios linfáticos muestran la linfa en busca de material antigénico extraño.

Cada ganglio linfático está rodeado por una cápsula fibrosa que es perforada por numerosos linfáticos aferentes, que vacían la linfa en los senos subcapsulares. El ganglio consta de una corteza externa en la que hay agregados de células que constituyen los folículos, algunos de los cuales contienen áreas centrales llamadas centros germinales y de regiones externas llamadas manguito. Los folículos que carecen de centros germinales se denominan folículos primarios, y los que los tienen son folículos secundarios. La médula interna contiene linfocitos menos densos y fagocitos mononucleares dispersos entre los sinusoides linfáticos y vasculares. A menudo se encuentran linfocitos y células accesorias muy próximas pero no forman uniones intercelulares, lo que es importante para mantener la capacidad de los linfocitos para migrar y recircular entre la linfa, la sangre y los tejidos. La linfa que llega a los senos subcapsulares se filtra a través de la corteza y de la médula y salen a través de un solo vaso linfático eferente situado en el hilio. (16)

En áreas particulares del ganglio están secuestradas diferentes clases de linfocitos y células accesorias no linfoides. Los folículos son áreas ricas en células B de los ganglios linfáticos. Los folículos primarios contienen de forma predominante linfocitos B maduros en reposo que aparentemente, no ha sido estimulados recientemente por antígenos. Los centros germinales, que aparecen en respuesta a la estimulación por antígenos proteicos dependientes de células T cooperadoras, contienen numerosos linfocitos grandes. Los centros germinales son los lugares donde las células B estimuladas por antígenos proliferan y dan lugar a una progenie que produce anticuerpos con una elevada afinidad por el antígeno. Las células dendríticas foliculares, que residen en los centros germinales, muestran los antígenos sobre su superficie y activan de forma selectiva a las células B que se unen al antígeno con alta afinidad. Las células plasmáticas completamente desarrolladas salen de los centros germinales y pueden migrar fuera de los ganglios linfáticos a otros tejidos. (16)

Los linfocitos T se localizan de forma predominante entre los folículos y en la corteza profunda, las llamadas áreas parafoliculares. La mayor parte de estas células T son células T cooperadoras CD4+ entremezcladas con células CD8+ relativamente escasas. Los linfocitos T nativos, que no habían sido estimulados por sus antígenos extraños específicos, entran en los ganglios linfáticos a través de la linfa o de las vénulas

especializadas cubiertas por endotelio cuboidal, denominadas vénulas de endotelio alto, que abundan en las zonas ricas en células T. Aquí las células T se encuentran con antígenos extraños que han sido transportados al ganglio en linfa, las células dendríticas interdigitantes, que también abundan en las áreas de células T, así como otras células T nativas. De este modo, los ganglios linfáticos son los lugares en que se inician las respuestas de las células T frente a los antígenos proteicos que se llegan en la linfa.(16)

La médula contiene linfocitos dispersos, gran número de macrófagos y células dendríticas y, en los ganglios a los que drenan lugares de inmunización, numerosas células plasmáticas, todas las cuales se entremezclan con los canales linfáticos.

La estructura de los ganglios linfáticos no es fija, sino que cambia con la exposición al antígeno. Por ejemplo, los centros germinales aparecen en la semana posterior a la inmunización, y gradualmente remiten tras la eliminación del estímulo antigénico.(16)

Bazo.

El bazo es un órgano que pesa unos 150 g en los individuos adultos, localizado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen. Está vascularizado por una sola arteria esplénica, que atraviesa la cápsula en el hilio y se divide en ramas cada vez más pequeñas que se rodean de trabéculas fibrosas protectoras y de soporte. Las arteriolas pequeñas están rodeadas por manguitos de linfocitos, llamados vainas linfoides periarteriales, a las cuales están unidas los folículos linfoides, algunos de los cuales contienen centros germinales. Las vainas linfoides periarteriales y los folículos están rodeados por un anillo de linfocitos y macrófagos, llamados zona marginal. Estos tejidos linfoides densos constituyen la pulpa blanca del bazo. Las arteriolas acaban al final en sinusoides vasculares, entre los que se encuentran dispersos un gran número de eritrocitos, macrófagos, células dendríticas, escasos linfocitos y células plasmáticas; esto constituye la pulpa roja. Los sinusoides acaban en vénulas que drenan a la vena esplénica, que transporta la sangre fuera del bazo a la circulación portal.

Los linfocitos y las células accesorias están dispuestos anatómicamente en el bazo como lo están en los ganglios linfáticos. Las vainas periarteriales contienen principalmente linfocitos T, siendo las dos terceras partes de la clase cooperadora CD4+ y una tercera CD8+. Los folículos y los centros germinales son predominantes zonas de células B, y tienen las mismas características anatómicas y funciones que en los ganglios linfáticos. Las zonas marginales contienen linfocitos B y células T CD4+. Los antígenos y los linfocitos entran en el bazo a través de los sinusoides vasculares; el bazo carece de vénulas de endotelio altos. La activación de las células B se inicia en las zonas marginales, adyacentes a las células T cooperadoras de las vainas linfoides. Las células B activadas migran posteriormente a los centros germinales o a la pulpa roja.

En principio, la función del bazo y su respuesta frente a los antígenos es muy similar a la de los ganglios linfáticos, siendo la diferencia esencial que el bazo es el principal lugar de las respuestas inmunitarias frente a antígenos transportados por la sangre, mientras que los ganglios linfáticos están implicados en las respuestas frente a los antígenos transportados por la linfa. El bazo es también un filtro importante de la sangre; sus macrófagos de la pulpa roja son responsables del aclaramiento de la sangre de sustancias extrañas y de eritrocitos viejos incluso en ausencia de inmunidad específica.(16)

OTROS ÓRGANOS PERIFÉRICOS.

Además de los ganglios linfáticos y del bazo, los linfocitos se encuentran dispersos ó formando agregados en muchos tejidos. Algunas de estas colecciones están anatómicamente bien organizadas y tienen propiedades especiales. Localizados por debajo de las mucosas del tubo gastrointestinal y de las vías respiratorias hay agregados de linfocitos y de células accesorias con una estructura y función similar a la de los ganglios linfáticos. Estos agregados son las placas de Peyer en la lámina propia del intestino delgado, las amígdalas en la faringe y los folículos linfoides submucosos en el apéndice y a lo largo de la vía aérea superior. Los tejidos linfoides de estos lugares constituyen el sistema inmunitario mucoso. El sistema inmunitario cutáneo consta de linfocitos y células accesorias situadas en la epidermis y la dermis. (16)

LINFOCITOS

La especificidad de las respuestas inmunitarias se debe a los linfocitos, que son las únicas células del cuerpo capaces de reconocer de forma específica y distinguir diferentes determinantes antigénicos. Esto se ha establecido a partir de varias pruebas:

1. La transferencia adoptiva de inmunidad humoral y mediada por células desde individuos inmunizados a otros nativos, puede alcanzarse sólo por medio de linfocitos o de sus productos secretados.
2. Algunas inmunodeficiencias congénitas y adquiridas se asocian a una reducción de los linfocitos en la circulación periférica y en los tejidos linfoides. Además, la depleción selectiva de linfocitos con fármacos, radiación o anticuerpos específicos altera las respuestas inmunitarias.
3. A menudo se encuentran linfocitos en un número elevado en los lugares de inmunización o en los tejidos linfoides a los que drenan esos lugares.
4. La estimulación de linfocitos cultivados por antígenos conduce a respuestas in vitro que muestran muchas de las características de las respuestas inmunitarias inducidas bajo condiciones in vivo más fisiológicas.
5. Lo que es más importante, los receptores específicos de alta afinidad de los antígenos son producidos por linfocitos y no por otras células.

Desarrollo y heterogenicidad linfocitaria

El linfocito pequeño tiene de 8 a 10 micras de diámetro y tiene un gran núcleo con una heterocromatina densa. Hay un anillo delgado de citoplasma que contiene unas pocas mitocondrias, ribosomas y liposomas, pero no organelos especializados. Los linfocitos constan de distintos subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos, aunque todos parecen morfológicamente similares. Una clase de linfocitos es la de los linfocitos B, así llamados porque en los pájaros se vio inicialmente que maduraban en un órgano llamado bolsa de Fabricio. En los mamíferos, no hay un equivalente anatómico de esta bolsa y los primeros estadios de maduración de la célula B ocurren en la médula ósea. De este modo, linfocitos "B" se refiere a derivado de la bolsa o de la médula ósea (en inglés, bone marrow). Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los receptores de antígeno de los linfocitos B son formas de anticuerpos unidas a la membrana. La interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia la secuencia de activación de la célula B, que culmina en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos. (16)

La segunda clase principal de linfocitos son los linfocitos T, cuyos precursores surgen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo (el nombre de linfocitos "T" se refiere a que deriva de timo). Los linfocitos T se subdividen además en poblaciones funcionalmente, siendo las mejor definidas las células T cooperadoras y las células T citolíticas (o citotóxicas). Las células T no producen anticuerpos. Sus receptores de antígenos son moléculas de membrana diferentes, aunque estructuralmente relacionadas con los anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores y citolíticos muestran una inusual especificidad hacia los antígenos: reconocen sólo antígenos peptídicos unidos a proteínas que se codifican en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan sobre la superficie de otras células. Como resultado de ello, estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no a los solubles. En respuesta a la estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan hormonas proteicas llamadas citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T así como de otras células, incluidas las células B y los macrófagos. Las citocinas también atraen y activan a los leucocitos inflamatorios, incluidos macrófagos y granulocitos, proporcionando importantes conexiones entre la inmunidad específica de las células T y la inmunidad natural. Los linfocitos T citolíticos(LTC) lisan a las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Además de realizar las funciones de cooperadora y citolítica, las células T pueden inhibir las respuestas inmunitarias. (16)

El avance más importante en la identificación y análisis de estos subgrupos de células T ha sido el descubrimiento de que las poblaciones con funciones diferentes expresan proteínas de membrana diferentes. Estas proteínas sirven como marcadores fenotípicos de las diferentes poblaciones linfocitarias. Por ejemplo, la mayor parte de las células T cooperadoras expresan una proteína de superficie llamada CD4, y la mayor parte de los LTC expresan un marcador diferente llamado CD8. Los anticuerpos contra tales marcadores pueden, por lo tanto, utilizarse para identificar y aislar diferentes poblaciones linfocitarias. Muchas de las proteínas de superficie inicialmente reconocidas como marcadores fenotípicos de diferentes subpoblaciones linfocitarias resultó que, tras su análisis posterior, desempeñaban importantes tareas en las funciones biológicas de estas células. Estos marcadores se denominan con la nomenclatura unificada CD que significa "cluster of differentiation" (en español, grupos de diferenciación) y se refiere a los grupos de anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse para identificar la estirpe o estadio de diferenciación de los linfocitos, y de este modo distinguir una clase de linfocitos de otra. Los métodos inmunológicos posibilitan la detección de antígenos, moléculas de inmunoglobulina y receptores en la membrana celular que pueden ser específicos para una línea celular o para un estadio madurativo o bien pueden tener una distribución más amplia; se dispone de heteroantisueros contra inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas, además de un gran número de anticuerpos monoclonales. Existen gran cantidad de anticuerpos monoclonales que han sido estudiados en distintas reuniones de trabajo ("Workshop") celebradas en París (1982), Boston (1984), Osford (1986) y Viena (1989). Actualmente se conocen 78 CD (o grupos de diferenciación antigénicos) que agrupan anticuerpos monoclonales de características similares y/o idénticas, y se hallan definidos por un número. Un grupo o CD puede incluir una serie de anticuerpos monoclonales que detectan diferentes epítomos de una molécula y por tanto sus propiedades funcionales, bioquímicas, y su reactividad con células hematopoyéticas puede no ser idéntica. (6,16,18,19)Estos CD se distribuyen de la siguiente forma:

Antígenos linfoides T.....	12 CD
Antígenos linfoides B	17 CD
Antígenos mieloides	11 CD
Antígenos megacariocitos y plaquetares	10 CD
Antígenos de activación	6 CD
Antígenos no específicos o de células NK	20 CD

Marcadores característicos de la diferenciación linfoide T

El método de identificación de los linfocitos T consiste en la formación de rosetas espontáneas con hematíes de carnero. La naturaleza de esta interacción se ha esclarecido con la caracterización de la molécula del receptor CD2 y su ligando LFA-3.

Además del CD2 existen otros marcadores específicos o altamente asociados con el linaje T como CD1, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. (18)

La transferasa terminal desoxinucleotídica (TdT) no es específica de este linaje, pero es un indicador de la inmadurez celular. El HLA-DR se encuentra en otras estirpes celulares y sugiere un estado de inmadurez o de activación en las células T. El antígeno CD7 es el marcador más precoz de las células T y se expresa durante toda su maduración calificándose como pan T. La expresión del CD3 en el citoplasma es más precoz que su aparición en la membrana. (18)

TIPO CELULAR	UBICACION	MARCADORES
Protimocito	MO	TdT, HLA-DR, CD7 CD2(in), CD3ci
Timocito inmaduro	Timo	TdT, CD7, CD2, CD5, CD3ci, CD38, CD1, CD4/CD8
Timocito común	Timo	TdT(des), CD7, CD2, CD5, CD3ci, CD38, CD1, CD4/CD8
Timocito maduro	Timo	TdT(des), CD7, CD2, CD5, CD3, CD38, CD1(des), CD4 y/o CD8
Linfocito T maduro	SP y TL	CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 o CD8
Linfocito T activado	SP y TL	HLA-DR, CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 o CD8

MO: Medula ósea

SP: Sangre periférica

TL: Tejidos linfoides

(in) : Indica que el antígeno inicia su expresión en este estadio

(des): Indica que la expresión de este antígeno desaparece durante este estadio

CD3ci: CD3 citoplasmático

CD4/8: Coexpresión de los antígenos CD4 Y CD8

Marcadores característicos de la diferenciación linfoide B

El método clásico de identificación de linfocitos B es la detección de inmunoglobulinas

de superficie (IgS) que aparecen en estadios intermedios de diferenciación de los linfocitos B.

El CD19 se considera como un marcador pan B y aparece en estadios muy tempranos de diferenciación y persiste hasta la célula plasmática que, al igual que para otros marcadores (CD10, CD20, CD21, CD22, IgS) es negativa. La célula plasmática presenta como marcadores característicos el CD38 Y EL PCA-1 junto con la expresión de inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgC).(18)

La detección de TdT y HLA-DR no es específica de los linfocitos B, pero es útil en el establecimiento del estadio de maduración, mientras que el HLA-DR se encuentra durante toda la maduración B, excepto en las plasmáticas, la expresión de la TdT y CD34 está restringida a estadios inmaduros.

Los marcadores CD10, CD22, Ig,CD20 Y CD21 se expresan secuencialmente en la superficie de las células B si bien la expresión de CD22 es más precoz a nivel citoplasmático. El antígeno CD5 a pesar de ser un pan T se expresa en una subpoblación de células B y en las células neoplásicas de la leucemia linfática crónica B.(18)

TIPO CELULAR	MARCADORES
Célula pre-pre-B	HLA-DR, TDT, CD19, CD10(in), CD22 ci,CD38, CD24
Célula pre-B	TdT, HLA-DR, CD19, CD10, CD22, CD20, CD24,µC
Linfocito B inmaduro	HLA-DR, CD19;CD24, CD20, CD22, CD21, SigM
Linfocito B maduro	HLA-DR, CD19, CD24, CD22,SigM, CD20, CD21, SigD
Linfocito B activado	HLA-DR, CD19, IgS, CD38*, CD20, CD10*,CD23, CD71, CD25
Célula plasmática	IgC, CD38, PCA-1
Linfocitos B con memoria	HLA-DR, CD19,CD24,CD20,CD22, IgG o M, IgG o A

CD22 ci: CD22 citoplasmático

IgC: Inmunoglobulinas intracitoplasmáticas

IgS: Inmunoglobulina de superficie

(in): Indica que el antígeno inicia su expresión en este estadio

*: Se expresa en una fracción de células

SigD: IgD de membrana

SigM: IgM de membrana

µC: Cadena µ intracitoplasmática

Marcadores característicos de la diferenciación de células monomieloicitica, eritroides y megacariocíticas.

Los antígenos CD13, CD41, CD42 la glicoforina A, son marcadores específicos para la serie monomieloicitica, megacariocítica y eritroide respectivamente, y pueden detectarse en células progenitoras inmaduras al igual que en otras más diferenciadas de sus respectivas estirpes.

El CD13 se considera un marcador pan-monomieloicitico que aparece en estadios muy tempranos de diferenciación de la serie monocitico-macrofágica, aparecen otros marcadores como CD15, CD11b,CD14, CD11c, y en la serie mieloide aparacen CD15 y CD11c.

Los antígenos CD34 y HLA-DR se hallan en estadios muy tempranos de diferenciación en la célula progenitora granulo-mono-eritro-megacariocítica, el CD34 persiste hasta las distintas células comprometidas, célula progenitora eritroide, célula progenitora megacariocítica. (18)

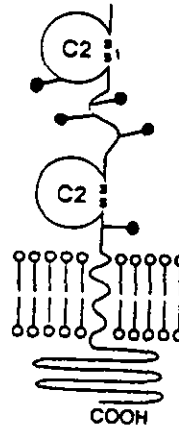
La tercera clase importante de linfocitos no expresa marcadores de células T ni B y, por lo tanto, se le denominó inicialmente población de células nulas. Ahora parece clara que la mayor parte de las células nulas son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos capaces de lisar diferentes células tumorales e infectadas por virus sin una estimulación antigénica clara. Por ello, a estos linfocitos se les llama linfocitos granulares grandes o células agresoras naturales (NK, del inglés natural killer), denominación que define un grupo morfológicos o funcional.(1,18)

Algunas de las características sobresalientes de los antígenos de las células linfoides son:

CD 19

Peso molecular
59154 polipéptidos

Tamaño del gen humano
8kb



Distribución en los tejidos

El CD 19 es expresado en todas las células B humanas precursoras CD10 (Antígenos CALLA) y la cadena μ intracitoplásmica. Este no es expresado en células plasmáticas. El CD19 está también presente en células dendríticas foliculares.

Estructura

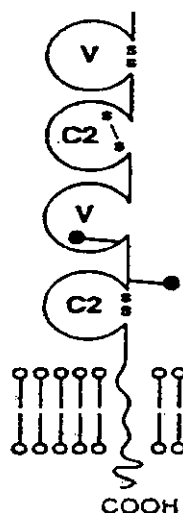
La región extracelular de CD19 consiste de dos dominios fijos -C2 IgSF separadas por una región que contiene un par de residuos Cys pero no tiene secuencia significativa

Función.

Los heterodimeros α/β y γ/δ reconocen el antígeno peptídico encontrado en los antígenos del MHC y la subsecuente señal de transducción mediada por cadenas guías a la activación de células T. La afinidad de la interacción entre el TcR y el MHC/complejo peptídico es del orden de $2 \times 10^6 M^{-1}$. La señal de transducción involucra tirosina kinasa y la activación de fosfolipasa C, seguida por un giro a fosfo-inositol y la activación severa de la vía del segundo mensajero. (19)

CD4

Peso molecular
48400 polipéptidos



Distribución en los tejidos.

El CD4 es expresado en algunos timocitos y aproximadamente en dos terceras partes de las células T de la sangre periférica, las cuales constituyen las células CD8 negativas. En humanos y ratas, pero no en ratón el CD4 es expresado en monocitos y macrófagos.

Estructura.

El dominio extracelular formado por cuatro dominantes IgSF. La estructura de los dominios del amino terminal, tiene que ser determinada por rayos-X, cristalografía, confirmando con ello la presencia de un enlace-Ig. El dominio 2 es caracterizado por disulfuro inusual dentro del dobles beta y en el dominio tres falta un disulfuro en la posición que se encuentra en los demás dominios IgSF.

Función.

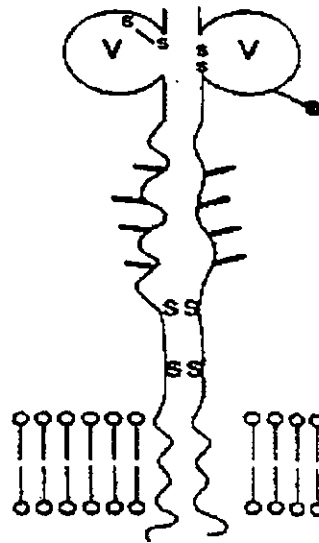
El CD4 de las células T es una molécula accesoria en el reconocimiento de antígenos extraños en asociación con los antígenos del MHC-clase II. Los anticuerpos monoclonales contra CD4 inhiben la función de las células T in vivo e in vitro.

El dominio citoplasmático del CD4 es fosforilado en los residuos de Ser 408,415,431, cuando las células T son activadas por el antígeno o por esteroides. El dominio citoplasmático interactúa con una tirosina-kinasa linfocito-específica llamada p56lck.

El CD4 es un receptor para el HIV-1 (Virus del SIDA) y la unión de la proteína viral gp120 a esta región es el amino terminal del dominio.(19)

CD8

Peso molecular

 α 23552 polipéptidos β 21351 polipéptidos

Distribución en los tejidos.

El CD8 es expresado sobre muchos timocitos: y aproximadamente en una tercera parte de las células T de la sangre periférica, las cuales constituyen las células CD4 negativas. El CD8 α puede ser detectado en algunas células NK en niveles bajos y se encuentra en todas las células NK de la rata.

Estructura.

En las células de los roedores, el CD8 es expresado como un heterodímero de CD8 α y CD8 β , esto también parece ser el caso para los humanos. El enlace Ig del dominio de CD8 α y CD8 β son separados por una secuencia transmembranal de una región rica en residuos de Pro, Ser y Thr. El NH2 terminal del polipéptido maduro tiene que ser establecido por una secuencia proteínica.

Función.

El CD8 actúa como un coreceptor con antígenos del MHC clase-I restringido a TcRs. En el desarrollo de las células T. La función de coreceptor CD8 es importante para la selección positiva de antígenos del MHC clase I restringido a células T CD8+. El dominio extracelular de CD8 α se liga al dominio α 3 del MHC clase I. El dominio citoplasmático de CD α se liga a tirosina quinasa p56 a través de la modificación hecha en dos residuos de Cys en una manera similar a CD4.(19)

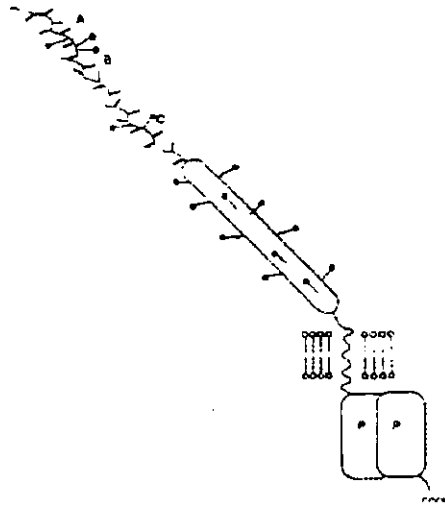
CD45

Peso molecular

(O) 127438 polipéptidos

(ABC) 145590 polipéptidos

Distribución en los tejidos.



Las proteínas del CD45 se encuentran en todas las células madres hematopoyéticas, excepto en la de los eritrocitos. Varias isoformas de CD45 son generadas por el entrecruzamiento alterno de los tres exones que pueden ser insertados inmediatamente después en el NH2 terminal de una secuencia de ocho aminoácidos encontrada sobre todas las isoformas. De las ocho posibles combinaciones de los exones, siete pueden ser encontradas a nivel de RNAm. Las diversas isoformas son expresadas sobre diferentes tipos de células linfoides y su expresión puede ser seguida con la utilización de un anticuerpo monoclonal que reconoce una sola isoforma o el conjunto de las ocho isoformas. Los epitopes relevantes son llamados CD45RA, CD45RB, CD45C y CD45O respectivamente. Las células B expresan una isoforma simple. Entre las células T periféricas CD4+ se encuentran uno o dos extra exones. Esta expresión diferencial se utiliza para definir las subespecies de las células T CD4+, en las cuales las células T nativas expresan esos exones, donde las células activadas y las células de memoria expresan formas incluidas en esos exones en niveles bajos. Los timocitos expresan en niveles bajos la isoforma Mr del CD45. Las isoformas expresadas del CD45 en las Cel. CD8+, cel. NK, monocitos, macrófagos, granulocitos y células denticíticas linfoides no están caracterizados, aunque es sabido que esas células expresan el CD45.

Estructura.

El dominio extracelular de CD45 tiene 391 a 552 aminoácidos de largo con 11-16 ligandos-N para sitios de unión para carbohidratos. El código de la secuencia para proteína de los exones 3-8 es rico en Ser, Thr y Pro y tiene múltiples ligandos-O de carbohidratos. El resto del dominio extracelular contiene 16 residuos de cisteína los cuales son conservados en el ratón, rata y humanos. El dominio citoplasmático es grande (700 aminoácidos) y contiene dos dominios fosfatasa fosfo-tirosina, uno de los cuales tiene actividad enzimática. El dominio intracelular es fosforilado en Ser, en respuesta a la activación PKC.

Función.

La expresión del CD45 es necesaria para la señalización del receptor células T. La actividad de la fosfatasa fosfo-tirosina es muy importante para la regulación de la actividad de tirosina-kinasa p56. No hay evidencia que los cambios en el dominio extracelular altere la actividad de la fosfatasa. (19)

La citometría de flujo está siendo involucrada en una gran cantidad de disciplinas tales como:

Análisis de partículas:

Tamaño de distribución	Diagnóstico de anemia
Refractibilidad	Diagnóstico de leucemia
Concentración	Detección de infección

Separación:

Enriquecimiento celular	Producción de anticuerpos
Concentración celular	Estudios de toxicidad
Verificación de análisis	

Inmunología:

Densidad de epitopes	Subespecies linfocitarias
Tipo de epitopes	Estructura de superficie celular
Proximidad de la superficie del receptor	Estudio de sistema inmune
	Predisposición a enfermedades

Biología Celular:

Contenido de DNA	Análisis de ciclo celular
Contenido de RNA	Bioquímica celular
Cariotopo de algunos cromosomas	Mutagénesis
Contenido de proteínas	Desordenes genéticos
Actividad enzimática	Toxicidad celular
pH intracelular	Función celular
Potencial de membrana	Actividad celular
Viabilidad	Análisis de cromosomas
Fluido de membrana	Estructura celular

De todas las disciplinas en la cual se aplica la citometría de flujo este estudio se enfoca más a la inmunología, dentro de ella a la inmunofenotipificación de subespecies linfocitarias. La cuantificación de poblaciones linfocitarias puede ser una información

invaluable para algunas situaciones clínicas, más en muchas otras es utilizada como una herramienta de diagnóstico. La evaluación de los linfocitos tanto de sangre periférica como de los tejidos tiene un fin común como método de laboratorio para asignar linajes en leucemias y linfomas, pronóstico en infecciones de inmunodeficiencia humana (ej. HIV), y la evaluación del potencial de la deficiencia inmunológica(1,5,6, 20,21)

El objetivo central del estudio es la capacidad de diferenciar las clases de linfocitos (ej. CD3+, cel. T) o subclases (ej. CD4+/CD3+, cel. T cooperadora). Esta selección se realiza utilizando anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos y valorados por C.F.

El instrumento permite que el juicio individual de fluorescencia múltiple y mediciones no fluorométricas de un gran número de células rápidamente. Esto tiene la ventaja de poder identificar dos o más características superficiales (o intracelulares) simultáneamente en cada célula individual. Esto facilita la evaluación de las subclases de linfocito, diferenciación y estado de activación.

Las células pueden ser distinguidas por la presencia de un marcador. Esos marcadores por lo general son glicoproteínas que pueden ser expresadas, sobre la superficie celular o intracelularmente. Esos marcadores pueden ser expresados particularmente por un tipo de células o linajes que se encuentran distribuidos en diferentes cantidades en otros tipos de células o linajes.

Dentro de la inmunofenotipificación se utilizan anticuerpos caracterizados (policlonales o monoclonales), que son directamente, dirigidos a un marcador de superficie celular, tales anticuerpos son utilizados en la identificación y cuantificación de células hematopoyéticas, así como células no-hematopoyéticas. Para llevar a cabo ello se realiza en forma de Inmunofluorescencia Directa o Indirecta.

La técnica de inmunofluorescencia directa utiliza anticuerpos que están directamente conjugados con un fluorocromo (eg. Isocianato de fluorescína (FITC) o la ficoeritrina (PE)). Las células aisladas son primeramente incubadas con un anticuerpo primario que está directamente ligado al fluorocromo, se lava, se resuspende y posteriormente se analiza por citometría de flujo(1). (FIG No. 5)

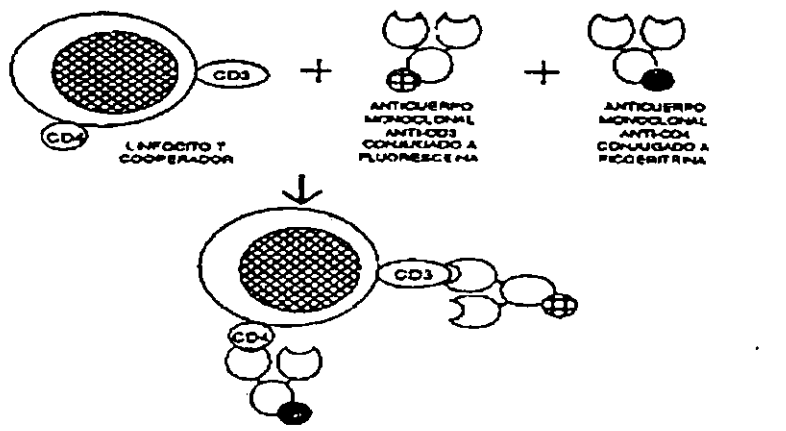


FIG. 5 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La técnica de Inmunofluorescencia indirecta, requiere de una incubación adicional al principio con el anticuerpo primario el cual es específico para evaluar el marcador de superficie, éste no está conjugado al fluorocromo. La primera incubación es realizada con un anticuerpo no conjugado, seguido por una segunda incubación donde se adiciona un anticuerpo conjugado a un fluorocromo (anticuerpo secundario) el cual es específico para el anticuerpo primario. El anticuerpo más comúnmente utilizado como anticuerpo secundario es un policlonal, anticuerpo de cabra-anti-cuerpo de ratón conjugado a fluoresceína, sin embargo para la prueba cruzada por citometría de flujo el anticuerpo secundario es cabra-anti IgG-humana. En los siguientes pasos, las células son lavadas, fijadas y leídas por citometría de flujo.(1)

Dentro de la inmunofenotipificación cabe mencionar que se puede llevar a cabo con un solo color (un fluorocromo) con dos o tres colores; por lo que es fundamental saber seleccionar los fluorocromos utilizados dentro del estudio a realizar, para ello se deben tomar en cuenta características como que éstos sean capaces de excitarse con longitud de onda luminosa, estable a su almacenamiento, que la longitud de onda excitadora sea diferente a la longitud de la luz emitida, que se descomponga mínimamente con la exposición a la luz. Siendo el FITC (el fluorocromo más utilizado como primer marcador y la PE como segundo marcador; posteriormente como tercer marcador se puede utilizar el Per-CP de esta manera los fluorocromos se unen de manera covalente a los anticuerpos, sin alterar la capacidad de ellos a los fluorocromos vinculados a los anticuerpos específicos constituyan un medio útil para observar los lugares donde se produce la reacción Antígeno-Anticuerpo. De ello como se menciona la utilización de dos a tres fluorocromos nos permite llevar a cabo dobles a triples tinciones, identificando con ello 4 subpoblaciones o 8 subpoblaciones en un solo tubo respectivamente.(1)

Para que la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos proporcione información válida en relación con los cambios o alteraciones en diferentes condiciones, y pueda ser de utilidad en la clínica, se deben establecer los valores de referencia apropiados en poblaciones elegidas cuidadosamente, de manera que los individuos no presenten ningún padecimiento que pudiera alterar los resultados. De ello se han realizado diversos estudios previos de citometría de flujo en los cuales se han encontrado variaciones en los humanos sanos. (11,12,14,22)

Primeramente de las variaciones biológicas que hay que considerar, es que los linfocitos están constantemente recirculando de los tejidos a la sangre, linfa, médula y tejidos linfoides. Los linfocitos sanguíneos representan solo el 2% del total de los linfocitos del cuerpo, el resto son temporalmente residentes primarios (timo, médula ósea del hueso) y secundariamente (vaso, nudos linfáticos, placas de Peyer). La relación entre los niveles sanguíneos de leucocitos y los leucocitos de los tejidos puede no ser establecido.(14)

Segundo las poblaciones linfocitarias varían ampliamente y rápidamente como resultado de la intervención de enfermedades vírales y bacterianas, psicológicas y estrés emocional además del uso de drogas(incluyendo nicotina y cafeína). (14,23)

Tercero la diferencia de género, edad y étnica, así como también fluctuaciones circadianas y estacionales.(11,12,13,14,23,24,25-30)

Hay variables técnicas que también afectan a los niveles de subpoblaciones linfocitarias tales como :

-Anticoagulante utilizado, debido a que de ello va a depender el período en el cual va a ser procesada la muestra.(1)

- a) EDTA-K3 deberá procesarse antes de 24 horas preferentemente en las 6 primeras horas. Transcurridas las 24 horas algunas subpoblaciones de linfocitos se ven afectadas.
- b) Citrato-Dextrosa ACD o heparina las muestras pueden conservarse hasta un máximo de 36 horas antes de procesarse.

El almacenamiento y transporte de las muestras deberá hacerse a temperatura ambiente entre 18 a 20 °C. Nunca a temperatura por debajo de 16 °C, ni superior a 37°C.(1)

- Método de preparación de las células.(1)

- a) Sangre total sin preparación previa, directamente del tubo primario.
- b) Separación mediante Buffy coat.
- c) Separación de células mononucleares por medio de Ficoll-Paque.

- Tipo de anticuerpo empleado en la identificación de las células (monoclonal o policlonal).(1,14)

- Método de análisis de las muestras. Debido a que hay métodos como el de Rosetas-E que son sensibles a las variaciones técnicas. Otros, tales como la cuantificación por microscopio de inmunofluorescencia son malos por que se tiene que contar un gran número de células. De igual forma la citometría de flujo tiene variaciones en cuanto al modelo del citómetro utilizado.(1,25,27)

Otro factor que influye para poder determinar adecuadamente los rangos de referencia es el tamaño de muestra que se utiliza para llevar acabo la determinación de ellos.(13,14)

Tomando en cuenta esto, se observa que existe una gran variabilidad en los resultados de cada uno de los valores expresados por los laboratorios, por lo que es recomendable que cada laboratorio cuente con sus propios rangos de referencias. Dentro del país, de lo que se sabe no se cuenta con unos valores de referencia para este tipo de estudios, solamente se toman los valores que se tienen por lo general en U.S.A. de tal modo que al usar los valores extranjeros hay un error más grande en poder diagnosticar a los pacientes mexicanos ya que de antemano se sabe que existe una gran diferencia entre ambas culturas de ahí la necesidad de contar con valores de referencia propios de subpoblaciones linfocitarias para la población que se atiende en el hospital del C.M.N. 20 de NOVIEMBRE.

Se requiere por lo tanto que para poder establecer los rangos de referencia de una determinada población el número de individuos estudiados sea grande para minimizar la contribución de cada uno de los factores anteriores sobre los resultados obtenidos.

Con esto, que los valores obtenidos como referencia para CD4 y CD8 permita servir como un mejor parámetro para pronosticar infecciones tales como HIV. Consecuentemente el monitoreo periódico de esas células es una parte fundamental del seguimiento en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

La pérdida de las células T CD4 es el indicador del progreso de la enfermedad, y los

recuentos celulares extremadamente bajos ($<0.05 \times 10^9/L$) están asociados con un mal pronóstico.(5,6)

El rol crucial que el recuento de células CD4 juega en el monitoreo de paciente con HIV se debe subrayar la importancia de proporcionar tanto el porcentaje como el número absoluto de subpoblaciones celulares. Por ejemplo un porcentaje bajo de células T CD4+ (ej. 20%) tiene una interpretación clínica diferente con relación a la cuenta absoluta de linfocitos de $.05 \times 10^9/L$ (con una cuenta de células CD4 de $0.10 \times 10^9/L$) contra $4.00 \times 10^9/L$ (con un recuento de CD4 de $0.80 \times 10^9/L$). Esos datos proporcionan un útil discernimiento con ciertas características útiles para poder caracterizar el desorden de inmunodeficiencia. La ausencia virtual de células T (y células NK) en ligada a X, combinada con inmunodeficiencia. La ausencia de células T CD8 en deficiencia severa de ZAP-70 combinada con inmunodeficiencia de células B en agammaglobulinemia ligada a X.(5,6)

De ahí la importancia de llevar a cabo una correcta inmunotipificación con la cual se contribuye a realizar un diagnóstico específico de la inmunodeficiencia así como la obtención de alguna información sobre los desordenes inmunoregulatorios.

De una forma conveniente al tener los valores de referencia y realizar el monitoreo de las subpoblaciones por C.F. se tiene como consecuencia una mejor selección de la terapia inmunosupresor

Bioseguridad para citometría de flujo.

La citometría de flujo es frecuentemente utilizada

en laboratorios clínicos y de diagnóstico para analizar muestras infectadas con HIV. Se ha hablado que el análisis en el citómetro de las muestras se generan gotas y aerosoles durante la operación normal del equipo, por lo que expone al operador a toxinas o a patógenos que están en las muestras. (32,33)

Limpieza del área de trabajo.

Para la desinfección del área de trabajo se prepara una solución fresca de hipoclorito de sodio 1/10 o 1/100 de una solución al 5%.(Puede ser del que se utiliza en la casa) todos los días. Nunca raspar la sangre seca, siempre hay que enjuagar primero con un detergente desinfectante antes de remover el material orgánico, no hay que usar blanqueador o alcohol (etilico o isopropilico) por que tiene baja actividad germicida en presencia de sustancias orgánicas. Esto es debido a la rápida evaporación que estos sufren.(32,33)

Manejo de la muestra.

Cuando se esta manejando el la muestra dentro del laboratorio se realiza con el tubo primario, pero si se desea se puede colocar dentro de un tubo secundario de plástico por si ocurre algún accidente, una vez que se comienza a trabajar con la muestra se debe considerar la posibilidad de derrames y el desarrollo de aerosoles al momento de quitar el tapón del tubo de colección, se recomienda abrir los tubos en un gabinete de bioseguridad clase I o II, envueltos en un pedazo de gasa para minimizar las salpicaduras de sangre y fluidos infecciosos. Si las muestras necesitan ser fijadas se

deben fijar dentro de un gabinete de bioseguridad. Para llevar a cabo una buena fijación de la muestra se debe aplicar el tiempo adecuado para obtener una buena fijación o en su caso seguir el protocolo que recomienda la casa comercial que distribuye el reactivo. En dado caso que se requiera llevar a cabo el análisis de muestras sin fijar como es el caso de los métodos de apoptosis, mediciones de calcio intracelular, viabilidad celular para estudios de función inmune. Todos estos estudios se deben realizar dentro de un gabinete de bioseguridad clase 2 y utilizar equipo de protección clase 3. El desecho de las muestras se realiza de acuerdo a las disposiciones de la institución y el estado que se encuentre. (32,33)

Consideraciones para el manejo del instrumento.

Para instrumentos en los cuales la introducción de la muestra es manual se requiere que el equipo se encuentre dentro de un gabinete de bioseguridad, para prevenir la inhalación de aerosoles o gotas de las muestras. Si el equipo posee un sistema de aspirado a vacío, se debe tomar la precaución de que todas las líneas estén en buen estado y evitar la fuga de aerosoles.

Protección del láser:

La mayoría de los citómetros contienen láser de bajo poder que se clasifican dentro de los de clase I. El láser clase I no requieren áreas especiales de trabajo. Más sin embargo los citómetros que poseen aspiración a vacío utilizan láser clase IV, que es un láser de alto poder, por lo que se recomienda evitar la exposición al rayo láser de los ojos. (33)

Para la colección y eliminación de los desechos se debe considerar las normas que se aplican dentro del estado que se esté operando el equipo, así como las reglas internas de la institución. Algo que se recomienda es que los recipientes que sirvan como tanques de almacenamiento final de los desechos estos contengan una concentración final del 10% de hipoclorito de sodio, de la misma manera se recomienda desinfectar todas las líneas de fluido del equipo. (32,33)

Para una mejor protección del usuario se debe llevar a cabo la elaboración de protocolos por escrito en los cuales se incluya el mantenimiento preventivo del equipo, así como el monitoreo continuo del personal tanto para poder valorar su estado de salud, como su grado de entrenamiento en el citómetro. (32,33)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha se ha determinado que hay diferentes factores que afectan el valor de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. (11,13,14)

Observándose las principales afectaciones en el decaimiento del sistema inmunológico por factores tales como la edad y secundariamente por el sexo de la persona, situación geográfica, raza, etc. De ello que surja la interrogante.

¿ Las diferentes estirpes de linfocitos T disminuyen o aumentan en la población Mexicana de igual manera que se ha observado en otras poblaciones?.

Ésta es la interrogante que se tratará de contestar con el presente proyecto.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Cuantificar las distintas especies de subpoblaciones linfocitarias de células T en sangre periférica, por citometría de flujo, en una población representativa y sana del C.M.N 20 de NOVIEMBRE, con el propósito de establecer valores de referencia de las subpoblaciones linfocitarias CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+, con el fin de que éstos sirvan como parámetros para el diagnóstico y seguimiento de las distintas anomalías del sistema inmunológico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Realizar las determinaciones de:

- a) Células CD3+/CD4+ y CD3/CD8+ en niños.
- b) Células CD3+/CD4+ y CD3/CD8+ adolescentes.
- c) Células CD3+/CD4+ y CD3/CD8+ adultos jóvenes.
- d) Células CD3+/CD4+ y CD3/CD8+ adultos.

2.- Determinar si existe alguna influencia de la edad en la cantidad de células CD4+ y CD8+ presentes en los diferentes grupos de estudio.

3.- Comparación de los resultados obtenidos en la población mexicana con otros grupos de estudio.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Con el envejecimiento se presentan en el hombre diversas alteraciones en la médula ósea, como es la aparición relativa de la médula ósea adiposa a la edad de 5 a 7 años y se evidencia su presencia en la adolescencia (11 a 14 años), cuando los huesos largos comienzan a desarrollar médula adiposa en sus porciones diafisarias. Este proceso aumenta gradualmente de las partes distales a las proximales de los huesos hasta que toda la médula roja (excepto en los extremos superiores del húmero y fémur), ha sido reemplazada, a la edad de 20 a 22 años. Dejando sólo algunas zonas funcionantes de la médula roja con actividad hematopoyética en huesos planos del organismo, (ej. esternón, vértebras, costillas e iliaco). (15) Todo este desplazamiento de médula ósea roja, condiciona a una disminución en la respuesta inmunológica con una consecuente disminución en la cantidad de linfocitos presentes en sangre periférica.

MATERIAL

- Tubo para cuenta absoluta TRUCOUNT (Becton Dickinson No. de catálogo 3403334).
- Tubos de poliestireno de 12 x 75 mm. Falcon.
- Tubos vacutainer con EDTA-K3 (Becton Dickinson No. de catálogo 34013293).
- Micropipetas de 20µl, 50µl, 450 µl. Clinipette.
- Frascos con capacidad de 100 ml.
- Probeta graduada de 100 ml. pirex.
- Pipetas graduadas de 5 ml.
- Cámara de oscuridad.
- Gradilla metálica

REACTIVOS

- Hipoclorito de sodio.
- Solución de formaldehído al 37%
- Formaldehído al 10%.
- Agua destilada
- Anticuerpo monoclonal TriTEST CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP. (Becton Dickinson No. de catálogo 340383).
- Anticuerpo monoclonal TriTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP. (Becton Dickinson No. de catálogo 340344).
- Perlas de calibración caliBRITE 3. (Becton Dickinson No. de catálogo 340486).
- Solución de Lisis FACS (10X), 100 ml. (Becton Dickinson No. de catálogo 349202).
- Buffer para citómetro (FACS FLOW, Becton Dickinson No. de catálogo 340398).
- Controles TruCOUNT (Becton Dickinson No. de catálogo 340335).

EQUIPO

- Citómetro de Flujo FACSCalibur, Becton Dickinson.
- Vortex Termolyne, Maxi Mix II
- Reloj con cronómetro.
- Agitador, Ames Aliquet Mixer.

MÉTODO

- Selección de pacientes y toma de muestra.

En un horario de 8 a 9 de la mañana se tomarán 5 ml de sangre venosa a hombres y mujeres sanos, de 0 a 78 años de edad, quienes deberán tener un ayuno de 6 a 8 hrs. y un descanso de 10 a 15 min. previo a la toma de muestra.

Las muestras para el estudio se clasificarán en cuatro grupos de acuerdo a la edad de la persona.

1. Grupo 1 0 a 9 años.
2. Grupo 2 10 a 18 años.
3. Grupo 3 19 a 30 años.
4. Grupo 4 31 a 51 años.
5. Grupo 5 52 a 78 años.

Las muestras de sangre identificadas se colocarán en agitador automático por espacio de 30 min. previo a la determinación. (la muestra debe procesarse dentro de las 6 hrs. primeras a la toma de muestra).

- Determinación de las células CD3+/CD4+ y CD3+/CD8.

La determinación de las células T CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ se realizará por medio de método de Lisado No Lavado (LNW) y se leerán en el citómetro de flujo FASCCalibur de Becton Dickinson.

- Análisis de los resultados.

El análisis estadístico consistirá en el análisis de varianza múltiple por ANOVA.

PROCEDIMIENTO

Recolección y preparación de la muestra.

La obtención de la sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa en un tubo de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA (tapón lila), El reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45, y los tubos TruCOUNT han sido validados con las fórmulas líquida y sólida de K3 EDTA. Para este procedimiento se requiere un mínimo de 100 µl de sangre entera. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante del tubo sobre el volumen mínimo de sangre que se debe obtener para asegurar un uso adecuado.

Se debe obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) y un recuento diferencial de la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para estar seguros de que el recuento de WBC está dentro del rango lineal .

La sangre anticoagulada y almacenada a temperatura ambiente (20° a 25° C) se debe de teñir dentro de las 48 horas de obtenida la muestra y luego se debe de analizar dentro de las 6 horas de haber sido teñida. Si las muestras se tiñen dentro de las 24 horas de obtenidas, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones que interfieren

No se deben usar muestras de pacientes que hayan sido fijadas y almacenadas previamente. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados erróneos. Las muestras obtenidas de pacientes que estén recibiendo medicamentos inmunosupresores pueden tener una resolución pobre. Los blastocitos pueden interferir con los resultados de la prueba. Las muestras con hemólisis se deben desechar.

El reactivo TriTEST CD 3/CD4/CD45 y el reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45 no ha sido validado para ser usado con heparina o dextrosa de ácido cítrico (ACD) líquida como anticoagulantes en la determinación de recuentos absolutos con tubos TruCOUNT.

Reactivo suministrado

*TriTEST CD3 FITC/ CD4 PE/ CD45 PerCP y TriTEST CD3 FITC/ CD8 PE/ CD45 PerCP con tubos TruCOUNT (Becton Dickinson, No. de catálogo 340402)

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- 1.- Microesferas CaliBRITE 3 (Becton Dickinson No. de catálogo 340402).
- 2.- Solución lisante FACS (10X), 100 ml Becton Dickinson, No. de catálogo 349202). Las instrucciones para diluir y las advertencias están en el folleto de instrucciones de la solución lisante FACS.
- 3.- Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
- 4.- Tubos VACUTAINER K3 EDTA para recolección de sangre (Becton Dickinson, No. de catálogo 6457) o equivalente.
- 5.- Tubos de pruebas desechables con tapa de poliestireno Falcon de 12 x 75 mm (Becton Dickinson No. de catálogo 2058) o equivalente.
- 6.- Agitador Vortex.

- 7.- Micropipeta con puntas (Pipeta electrónica BD, Becton Dickinson No. de catálogo 34013290; pipetman Rainin Instrument Co., Inc. o equivalente).
- 8.- Dispensador o pipeta de 450 µl para dispensar la solución lisante FACS.
- 9.- Líquido de revestimiento (FACSFlow Becton Dickinson, No. de Catálogo 340398 (E.E. Y Latinoamérica) o 342003), o equivalente.

Tinción de las células.

Después de la tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (20° a 25° C).

Pipeteo inverso

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD o una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos toques de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope: La muestra se aspira al soltar el botón y se expelle al volver a presionar hasta el primer tope.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expelle un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer tope, dejando el exceso de muestra en la punta.

Tinción.

1. Para cada muestra de paciente, se debe rotular un tubo de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra.
Para recuentos absolutos, se debe rotular un tubo TruCount en lugar del tubo de 12 x 75 mm.
NOTA: Antes de usarlo, verifique que el sedimento de microesferas del TruCOUNT esté intacto y dentro del retenedor de metal al fondo del tubo. Si no es así, deseche el tubo TruCOUNT y réplacelo con otro.
2. Pipetar 20 µl del reactivo TRiTEST CD3/CD4/CD45 al fondo del tubo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.
3. Pipetar 50 µl de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo el tubo.
NOTA : Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor.
4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25° C).
5. Anadir 450 µl de solución lisante FACS IX al tubo.
6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle, Incubar 15 minutos en al obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está ahora lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo.

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°).

Agitar las células suavemente en el Vortex (a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.

Adquirir y analizar los datos en la modalidad de lista con el software MultiSET. Antes de la adquisición de las muestras, se debe de ajustar el umbral para minimizar la presencia de restos y asegurar que las poblaciones que interesan estén incluidas.

PARA LA CALIBRACION DEL CITOMETRO DE FLUJO

- Se selecciona con el cursor la manzana; aparece un menú y se selecciona **FACScomp**.
- Aparece el mensaje de bienvenida al programa.
Se dan los datos de :

- a) Operador
- b) Institución
- c) Director del Laboratorio.

Llenado esto se da un **CLICK** en **ACCEPT**

Aparece un menú en el cual nos permite escoger el tipo de calibración; así mismo nos da la opción de poder alimentar los lotes de las diferentes perlas de calibración a utilizar para tal efecto.

- a) Para cambiar el NO. de lote de las perlas únicamente, nos posicionamos en cada cuadrado de las perlas a cambiar, se borra el No. de lote anterior y se alimenta el nuevo.

- b) Se hace la selección del ensayo de calibración, para lo cual tenemos tres opciones:

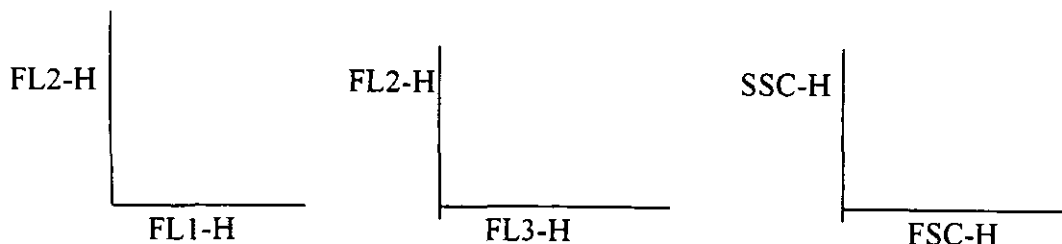
- LYSE/WASH
- LISE/ NO WASH
- HLA-B27 CALIB.

Para nuestro caso seleccionamos:

- LISE/ NO WASH**

Una vez hecho esto, iniciamos el proceso con **RUN**.

- Aparece una pantalla con diferentes ventanas de adquisición.



- Visualizada esta pantalla se cambia el tubo de agua que está en la aguja de muestra y se coloca el tubo con las perlas no teñidas.
- Se selecciona iniciar el proceso en el **Citómetro** se presiona el botón que tiene la palabra grabada **RUN** y se da la velocidad de flujo deseada que por lo regular es en alta **HI**.
- En la pantalla de la computadora se da un **CLICK** en **START**; aparece un reloj que indica el inicio del proceso, en este caso debemos ver que el **EVENT RATE** se mayor a 400 eventos.
- Una vez que esta parte de la calibración ha sido aceptada aparece una nueva pantalla para realizar la **COMPENSACIÓN**. Para realizar la compensación se sustituye el tubo de las perlas sin teñir por el tubo de perlas teñidas.
- De igual forma para iniciar el proceso de compensación el equipo debe estar en **RUN Y HI**, se posiciona el cursor en **START** y se da un **CLICK**.
- Se observa que el **EVENT RATE** sea mayor a 400 eventos, a su vez se observa que la diferencia entre las fluorescencias sea el adecuado.

FL1- FL2%
FL2- FL2%

FL2-FL3%
FL3-FL2%

Una vez que las diferencias entre las fluorescencias es el correcto se inicia el proceso de ajuste de **SENSIBILIDAD** en forma automática con el mismo tubo de perlas teñidas por lo que no se necesita realizar ningún cambio.

- Terminado el ajuste de **SENSIBILIDAD** emite el equipo un reporte en el cual nos presenta todos los resultados de la calibración.
- Para poder imprimirlo se da un **CLICK** en **QUIT**.

Resultados.

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como el número de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

RECUESTO DE LINFOCITOS CD4 Y CD8.

Se posiciona el cursor en la manzanita aparece el menú.

- Se selecciona **MultiSET** y se abre.
- Aparece el mensaje de bienvenida al programa y junto con ello los siguientes datos.
 - a) Operador
 - b) Institución.
 - c) Director de Lab.

Una vez alimentado estos datos se da un **CLICK** en **ACCEPT**.

- Aparece una pantalla en la cual nos da la opción de cómo queremos manejar nuestros datos y donde los queremos almacenar.
- Para ello en el recuadro de **DATA SORCE**, seleccionamos:
FROM CYTOMETER- ACQUISITION WITH ANALYSIS.
- Para salvar en forma automática la información de la corrida del día en los siguientes archivos:
 - a) Data File.
 - b) Laboratory Report
 - c) Physican Report
 - d) Summary Report
 - e) Export Document

Se realiza lo siguiente.

 - Se selecciona **LOCATION**
 - Aparece una nueva ventana, en ella se selecciona **DESKTOP**.
 - En un recuadro de la misma pantalla aparece **FACStation** se selecciona y se abre (**OPEN**).
 - Aparecen los archivos de la **FACStation** se busca y se selecciona **C.M.N. 20 DE NOV.**; se abre (**OPEN**).
 - Aparecen los archivos de la carpeta **C.M.N 20 de NOV.**, se busca y se selecciona **HISTO**, se abre (**OPEN**).
 - Aparecen los archivos de **HISTO** y se busca la carpeta de **TRES COLORES** y se abre (**OPEN**).
 - Aparecen los archivos de **TRES COLORES**, se selecciona **2000** se busca el mes que se este trabajando y se abre (**OPEN**).
 - Una vez seleccionado el mes en que se esta trabajando se posesiona uno en **NEW** se da un **CLICK** y aparece una ventana en la que pide el nombre de la nueva carpeta. Se escribe el nombre en el cuadrado y se pica **CREATE** y ahora en un recuadro aparece **SELECT + el nombre de la carpeta**, se selecciona y se da **CLICK**.

De esta forma se realiza la ruta para poder salvar todos los datos en cada uno de los archivos. Habiendo únicamente una diferencia en cuanto a:

- a) Summary Report

b) Export Document

El último paso es diferente en ambos no aparece **SELECT** + el nombre de la carpeta, en su lugar aparece en un recuadro **OK** se selecciona y se da un **CLICK**.

- Seleccionado donde se van a salvar nuestros archivos se da un **CLICK** en **ACCEPT**.
- Aparece una pantalla que nos da **ACCESO A FACScomp** para calibrar el equipo, a su vez menciona el tiempo que tiene de efectuada la calibración.
- En esta ventana en la parte inferior aparecen varios mensajes como :
 - a) **SKIP FACScomp**
 - b) **LAUNCH FACScomp**
 De lo cual la primera es para saltarnos la calibración y la segunda por si se requiere realizar la calibración.

Aparece una nueva ventana en la cual nos da las opciones de lo que nosotros queremos que nos imprima en el **REPORTE FÍSICO**, seleccionamos con una **X** si lo queremos impreso si no, se deja en blanco.

En esta misma pantalla hay la opción de poder:

- a) Cambiar los Rangos de referencia para las subpoblaciones.
- b) Formar los paneles con los anticuerpos disponibles.
- c) Alimentar los diferentes tipos de reactivos a usar.
- d) Los lotes de los reactivos

Si nada de esto se va a modificar se presiona uno en **ACCEPT** y se da un **CLICK**.

- Aparece la pantalla para programar las muestras, estas son programadas de la siguiente forma:
- **NOMBRE**
- **SAMPLE ID**
- **CASE NUMBR**
- **PANEL NAME: CD4/CD8/CD45 + TRUC**

una vez terminada la programación se inicia el procedimiento dando un **CLICK** en **RUN**.

- Se comienzan a pasar las muestras de acuerdo a la lista de programación en el siguiente orden:
- 1.- **TUBO B+NO. DE MUESTRA (CD3/CD4/CD45)**
- 2.- **TUBO C+NO. DE MUESTRA (CD3/CD8/CD45)**

Para ello en el Citómetro se presiona la tecla que tiene grabado la palabra **RUN** además de seleccionar la velocidad de flujo que por lo regular es alta (**HI**).

Se coloca el primer tubo de la muestra y en la pantalla se da un **CLICK** en **ACQUIERE**, una vez que se termina el recuento del primer tubo se oye una alarma de

que ya terminó aparece el **LAB REPORT** y en esta pantalla se posiciona uno en **CONTINUE** y se da un **CLICK**.

- Se cambia el tubo No.1 por el Tubo No. 2 y se da un **CLICK** en **ACQUIERE**.
- Terminado el recuento aparece el **LAB REPORT** se da un **CLICK** en **CONTINUE**.
- Aparece el **PHYSICAN REPORT** y se da **NEXT**.
- De esta forma se siguen pasando las demás muestras.

Para salir aparece el sumario de la programación, en ella nos aparece la opción de poder programar más muestra (**MORE TESTS**) o de salir (**QUIT**).

Para salir nos posicionamos en **QUIT** y se da un **CLICK**.

Nos pregunta que si queremos salir se le da **QUIT**, le decimos que **SI**.

Posteriormente nos aparece si queremos salvar o no los cambios para lo cual le decimos que **DON'T SAVE**.

Terminado el procedimiento nos regresa al menú principal.

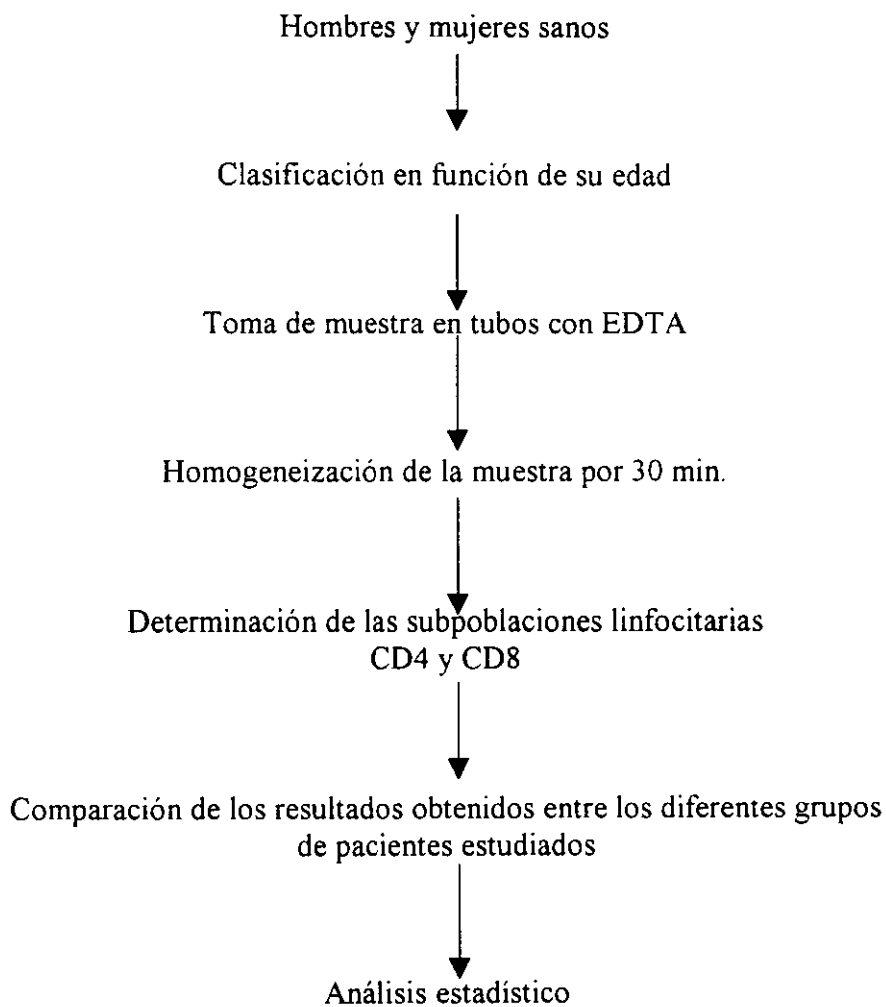


Diagrama de flujo 1. Metodología de la determinación de los valores de referencia de subpoblaciones linfocitarias.

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN CADA INTERVALO DE EDAD.

CUADRO No. 1 INTERVALO DE EDAD DE 0 a 9 AÑOS

	N	DE	SEXO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
EDAD	6.375	2.264	8	3.000	9.000	7.000
CTA. ABS. DE LINF.	3341.250	915.314	8	2314.000	4918.000	3098.000
CD3+/ CTA ABS.	2155.750	575.362	8	1116.000	3166.000	2128.000
CD3+ % DE LINF.	65.000	12.340	8	44.000	76.000	69.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	35.125	8.357	8	22.000	47.000	35.500
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	1165.375	418.983	8	650.000	1970.000	1018.500
CD3+/CD8+ % DE LINF.	24.125	6.357	8	16.000	32.000	24.500
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	793.250	203.114	8	370.000	1017.000	814.500
REL CD4/CD8	1.534	.621	8	.920	2.810	1.315

CUADRO No. 2 INTERVALO DE EDAD DE 10 a 18 AÑOS

	N	DE	SEXO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
EDAD	15.579	2.815	19	10.000	18.000	17.000
CTA. ABS. DE LINF.	2663.526	405.675	19	1996.000	3424.000	2639.000
CD3+/ CTA ABS.	1743.684	374.770	19	1128.000	2525.000	1729.000
CD3+ % DE LINF.	65.421	9.070	19	43.000	77.000	68.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	36.474	6.744	19	23.000	49.000	38.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	984.263	255.038	19	582.000	1400.000	970.000
CD3+/CD8+ % DE LINF.	25.000	5.907	19	14.000	34.000	26.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	659.789	183.223	19	380.000	1122.000	646.000
REL CD4/CD8	1.543	.432	19	1.020	2.710	1.360

CUADRO No. 3 INTERVALO DE EDAD DE 19 a 30 AÑOS

EDAD	23.830	3.384	47	19.000	30.000	23.000
CTA. ABS. DE LINF.	2335.000	604.753	47	1378.000	3887.000	2170.000
CD3+/ CTA ABS.	1589.085	487.675	47	844.000	2887.000	1453.000
CD3+ % DE LINF.	66.383	7.9000	47	49.000	82.000	67.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	39.426	6.230	47	29.000	57.000	38.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	960.638	331.248	47	533.000	1909.000	821.000
CD3+/CD8+ % DE LINF.	24.000	5.960	47	13.000	37.000	23.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	570.532	194.044	47	201.000	1002.000	559.000
REL CD4/CD8	1.762	.535	47	1.030	3.630	1.740

CUADRO No. 4 INTERVALO DE EDAD DE 31 a 51 AÑOS

				MINIMO	MAXIMO	TOTAL
EDAD	39.782	6.008	78	31.000	52.000	39.500
CTA. ABS. DE LINF.	2309.282	539.340	78	1362.000	3883.000	2193.500
CD3+/ CTA ABS.	1545.051	380.067	78	966.000	2663.000	1492.500
CD3+ % DE LINF.	66.756	6.537	78	51.000	79.000	67.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	42.038	5.733	78	31.000	58.000	41.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	959.987	261.252	78	497.000	1825.000	896.500
CD3+/CD8+ % DE LINF.	22.256	5.082	78	11.000	34.000	22.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	519.731	156.313	78	229.000	933.000	294.500
REL CD4/CD8	1.948	.563	78	1.060	3.320	1.895

CUADRO No. 5 INTERVALO DE EDAD DE 52 a 78 AÑOS

EDAD	59.158	8.758	19	52.000	77.000	55.000
CTA. ABS. DE LINF.	2254.053	582.850	19	1590.000	3592.000	1989.000
CD3+/ CTA ABS.	1391.263	409.883	19	730.000	2217.000	1356.000
CD3+ % DE LINF.	63.867	5.462	19	56.000	73.000	62.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	37.947	6.276	19	27.000	49.000	37.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	860.632	274.188	19	505.000	1384.000	775.000
CD3+/CD8+ % DE LINF.	20.947	6.493	19	12.000	35.000	20.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	460.368	176.442	19	147.000	837.000	473.000
REL CD4/CD8	2.032	.773	19	1.060	3.430	2.130

CUADRO No. 6 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN FUNCIÓN DE LA EDAD UTILIZANDO LA MEDIA Y P₂₅ y P₇₅

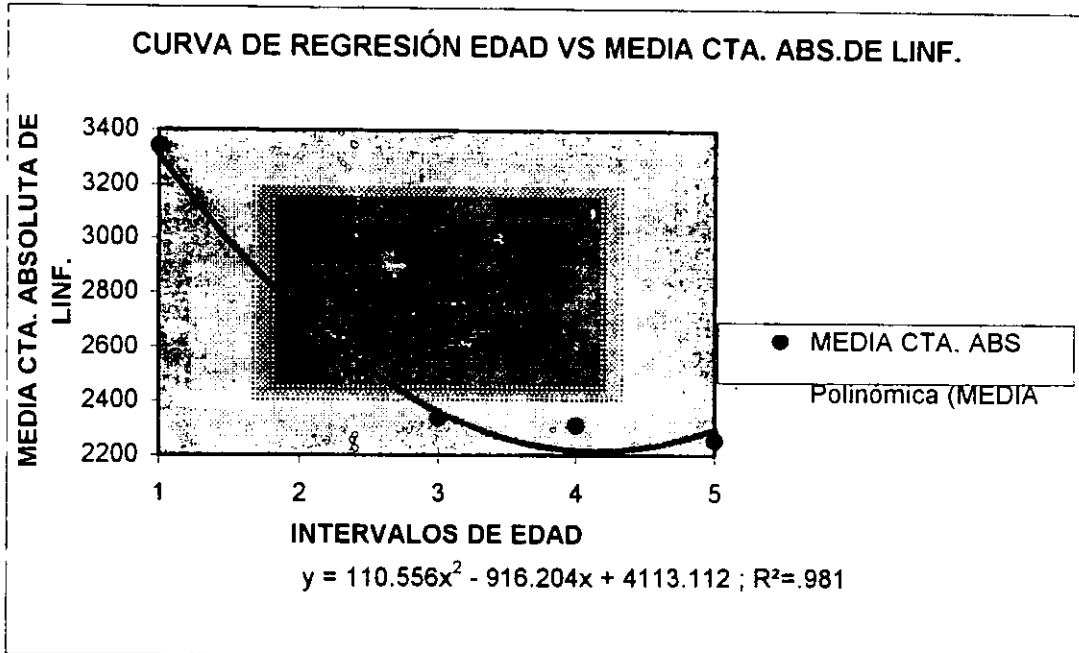
	MEDIANA (P ₂₅ -P ₇₅)		MEDIANA (P ₂₅ -P ₇₅)		MEDIANA (P ₂₅ -P ₇₅)		MEDIANA (P ₂₅ -P ₇₅)		MEDIANA (P ₂₅ -P ₇₅)	
CTA. ABS. DE LINF.	3098.000	2713.500-3937.500	2639.000	2329.500-3025.750	2170.00	1885.000-2664.250	2193.500	1972.000-2578.000	1989.000	1847.500-2659.000
CD3+ CTA. ABS.	2128.000	1987.500-2366.500	1729.000	1581.750-1929.750	1453.000	1280.500-1862.500	1492.500	1273.000-1819.000	1356.000	1054.000-1694.000
CD3+ % DE LINF.	69.000	56.500 - 74.500	68.000	61.250 - 72.500	67.000	60.000 - 71.000	67.000	63.000 - 71.000	62.000	60.000 - 68.000
CD3+/CD4 % DE LINF.	35.500	29.000-41.500	38.000	32.000 - 40.500	38.000	35.000 - 42.750	41.000	38.000 - 46.000	37.000	33.000 - 43.250
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	1018.500	948.000-1385.00	970.000	831.250 - 1130.750	821.000	763.750 - 1153.500	896.500	777.000 - 1081.000	775.000	674.000 - 1053.750
CD3+/CD8+ % DE LINF.	24.500	18.000 - 30.000	26.000	19.250 - 29.750	23.000	20.250 - 28.000	22.000	18.000 - 25.000	20.000	16.000 - 25.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	814.500	741.000 - 924.000	646.000	541.250 - 752.750	559.000	419.000 - 685.250	294.500	408.000 - 650.000	473.000	328.000 - 585.000
REL. CD4/CD8	1.315	1.110 - 1.8450	1.360	1.267 - 1.752	1.740	1.350 - 1.988	1.895	1.540 - 2.300	2.130	1.242 - 2.700

VALORES DE REFERENCIA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

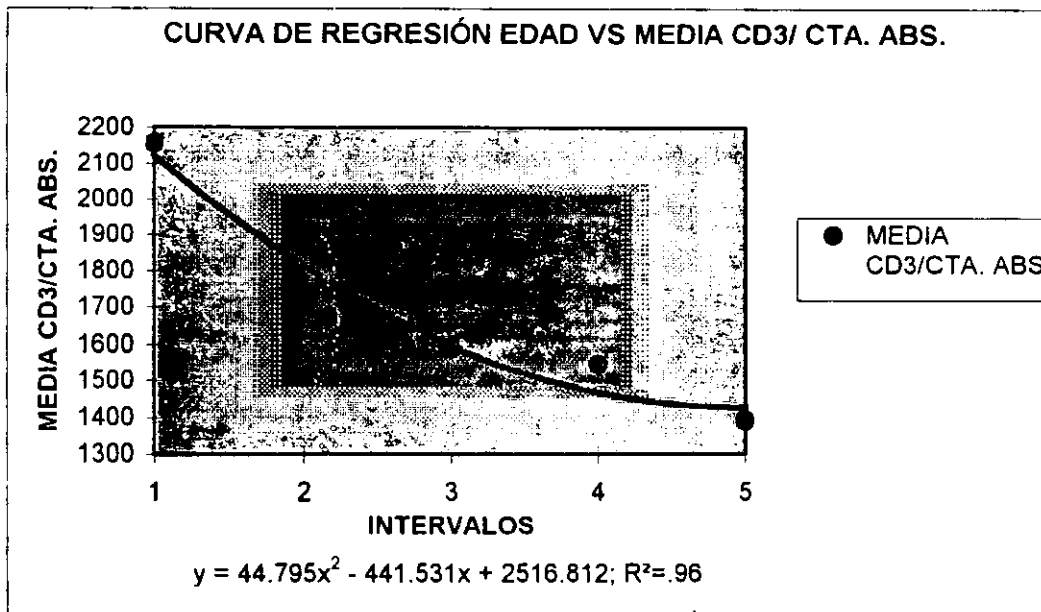
CUADRO No. 7 ANOVA de la regresión polinomial en cada subpoblación agrupada por Intervalos de edad.

	PRIMERA (0-10)	SEGUNDA (11-20)	TERCERA (21-30)	CUARTA (31-40)	QUINTA (41-50)	SEXTA (51-60)
CTA. ABS. DE LINF.	52.260	.0188	.991	.981	2295.05	2832.960
CD3+/ CTA ABS.	24.077	.0399	.980	.960	1506.603	1846.698
CD3+ % DE LINF.	33.615	.0009	.847	.718	64.717	66.475
CD3+/CD4+ % DE LINF.	7.189	.0188	.866	.751	36.132	40.083
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	10.330	.0092	.931	.867	935.150	1029.540
CD3+/CD8+ % DE LINF.	21.149	.0022	.975	.95	21.932	24.340
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	35.466	.0008	.998	.996	504.890	693.155
REL CD4/CD8	8.925	.0123	.974	.95	1.537	1.970

CURVAS DE REGRESIÓN INTERVALOS DE EDAD VS. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS

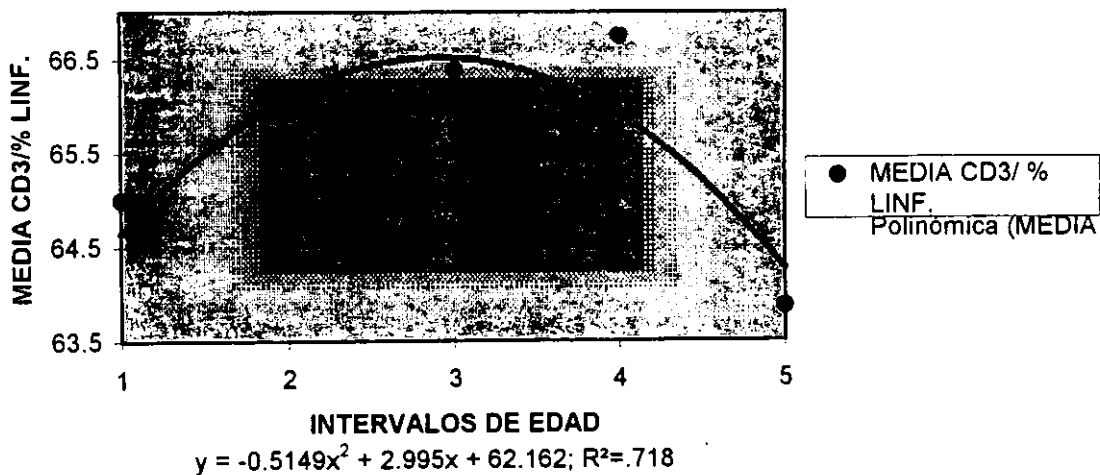


GRÁFICA No



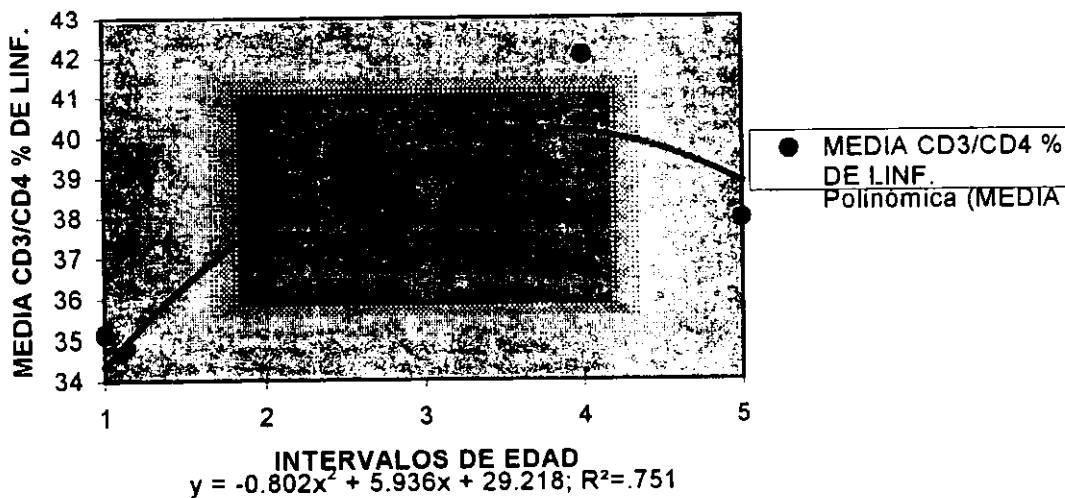
GRÁFICA No. 2

CURVA DE REGRESIÓN EDAD VS MEDIA CD3/%LINF.

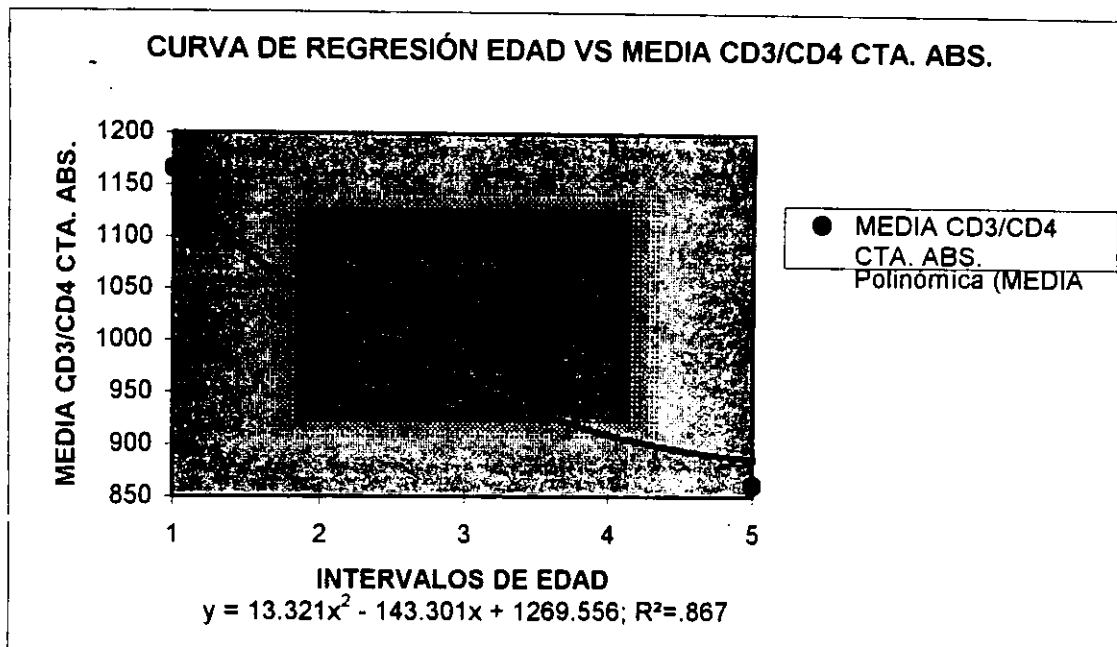


GRÁFICA No 3

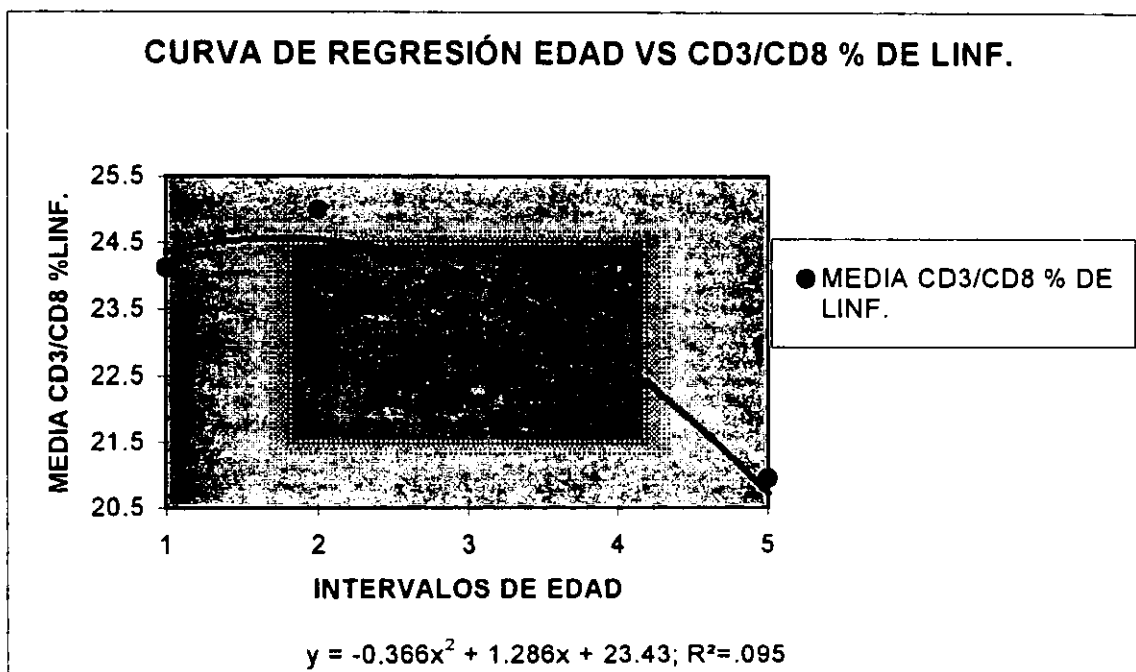
CURVA DE REGRESIÓN EDAD VS MEDIA CD3/CD4 % DE LINF.



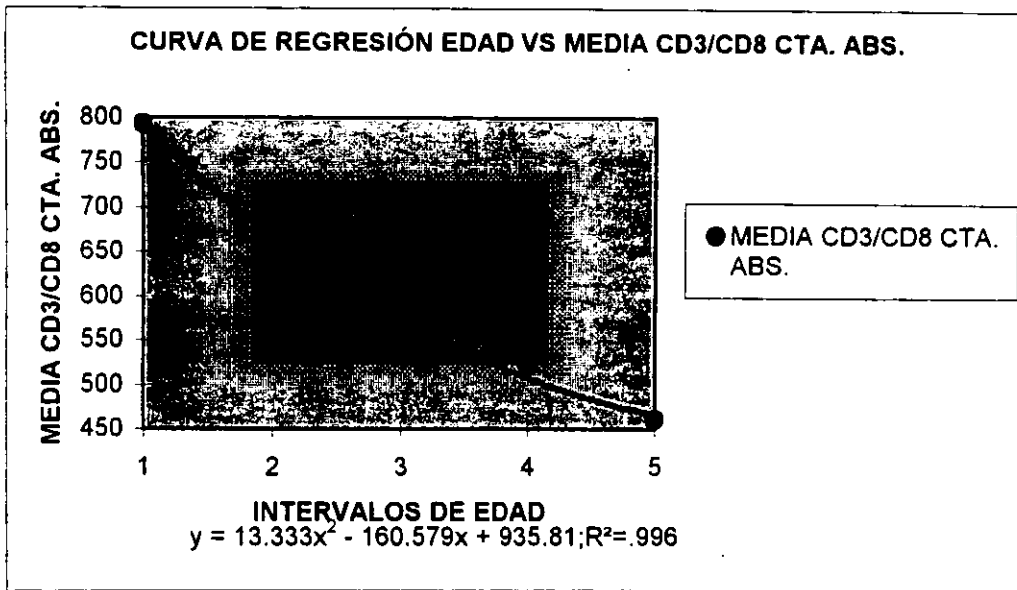
GRÁFICA No.4



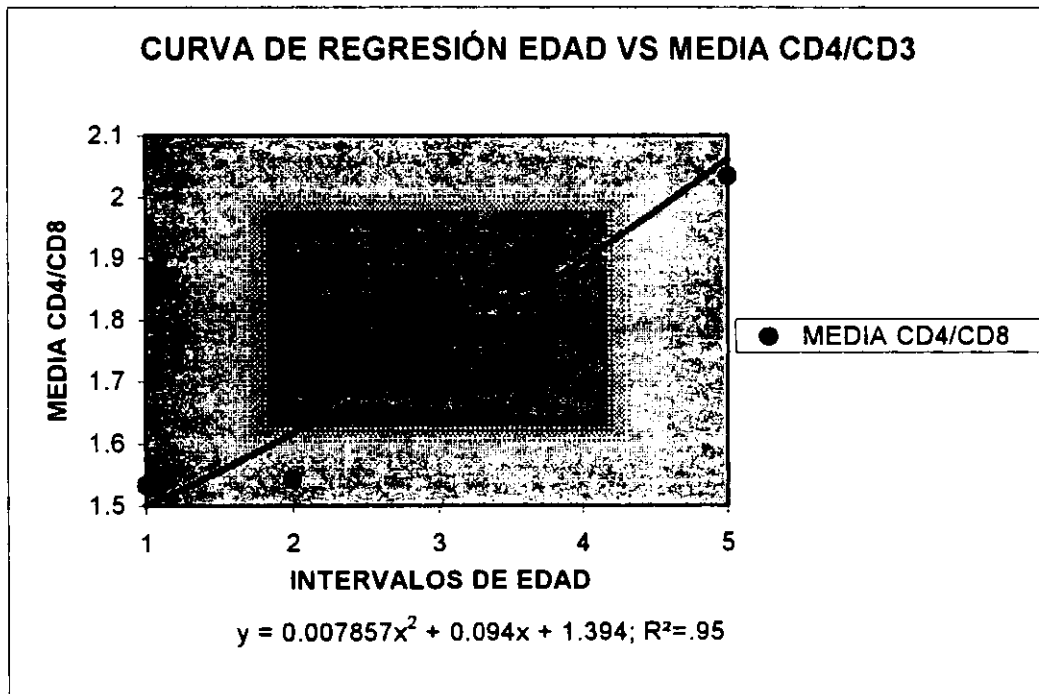
GRÁFICA No. 5



GRÁFICA No. 6



GRÁFICA No. 7



GRÁFICA No. 8

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA POR GRUPOS DE SEXO

CUADRO No. 8 GRUPO MASCULINO

	1990	1995	1998	1990	1995	1998
EDAD	32.733	13.750	90	3.000	70.000	31.000
CTA. ABS. DE LINF.	2382.744	612.391	90	1362.000	4918.000	2283.500
CD3+/ CTA ABS.	1541.656	426.645	90	844.000	2672.000	1440.500
CD3+ % DE LINF.	64.931	7.661	90	43.000	78.000	66.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	38.522	6.545	90	22.000	57.000	38.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	920.078	277.196	90	497.000	1825.000	849.000
CD3+/CD8+ % DE LINF.	23.189	5.667	90	11.000	37.000	22.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	55.889	183.952	90	201.000	1017.000	500.500
REL CD4/CD8	1.758	.543	90	1.020	3.630	1.720

CUADRO No. 9 GRUPO FEMENINO

	1990	1995	1998	1990	1995	1998
EDAD	33.988	15.701	82	6.000	77.000	35.500
CTA. ABS. DE LINF.	2401.805	623.502	82	1362.000	4488.000	2296.000
CD3+/ CTA ABS.	1636.927	466.770	82	730.000	3166.000	1561.000
CD3+ % DE LINF.	67.675	6.948	82	48.000	82.000	68.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	41.463	6.080	82	28.000	58.000	41.000
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	1001.159	308.028	82	497.000	1970.000	937.500
CD3+/CD8+ % DE LINF.	22.805	5.774	82	13.000	34.000	23.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	555.280	193.104	82	147.000	1122.000	555.000
REL CD4/CD8	1.927	.624	82	.920	3.430	1.855

CUADRO No. 10 PRUEBA t st. GRUPO MASCULINO vs GRUPO FEMENINO

	GD1 / GD1 / 4 DE LINEA		GD2 / GD2 / 4 DE LINEA		GD3 / GD3 / 4 DE LINEA		GD4 / GD4 / 4 DE LINEA	
	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO
	64.931	67.675	38.522	41.463	23.189	22.805	1.758	1.927
D.E.	7.661	6.948	6.545	6.080	5.667	5.774	.543	.624
n	90.000	82.000	90.000	82.000	90.000	82.000	90.000	82.000
p	<.001		<.001		<.001		<.001	

CUADRO No. 11 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN DE MEXICANOS ESTUDIADA

	ME	DE	n	MÍNIMO	MÁXIMO	TIPO
EDAD	33.331	14.682	172	3.000	77.000	33.000
CTA. ABS. DE LINF.	2391.831	615.975	172	1362.00	4918.000	2285.500
CD3+/ CTA ABS.	1587.076	447.459	172	730.000	3166.000	1505.500
CD3+ % DE LINF.	66.246	7.434	172	43.000	82.000	67.000
CD3+/CD4+ % DE LINF.	39.924	6.479	172	22.000	58.000	39.500
CD3+/CD4+ CTA. ABS.	958.733	294.253	172	497.000	1970.000	883.500
CD3+/CD8+ % DE LINF.	23.006	5.705	172	11.000	37.000	23.000
CD3+/CD8+ CTA. ABS.	554.552	187.818	172	147.000	1122.000	524.500
REL CD4/CD8	1.838	.587	172	.920	3.630	1.750

CUADRO No. 12 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE DIFERENTES POBLACIONES ESTUDIADAS.

	MEXICANOS (n=172)		ÁRABES (n=150)		CAUCÁSICOS (n=110)	
		D.E.		D.E.		D.E.
CD3+ % DE LINF.	66.246	7.434	* 76.000	6.000	** 73.000	6.200
CD3+/CD4+ % DE LINF.	39.924	6.479	* 42.000	6.000	** 43.000	7.500
CD4+/CD8+ % DE LINF.	23.006	5.705	* 40.000	7.000	** 33.000	7.500
REL. CD4/CD8	1.838	.587	* 1.100	.300	** 1.400	.600

* PRUEBA t st Mexicanos vs. Árabes $p < 0.001$

**PRUEBA t st Mexicanos vs. Caucásicos $p < 0.001$

- a) Datos de estudio
- b) Reichter, et. al 1991 (24)
- c) Shahabuddin et. al. 1995 (26)

CUADRO No. 13 CUENTA ABSOLUTA DE MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT PARA CD3+/CD4+/CD45+

NO. DE CORRIDA	CONTROL BAJO	CONTROL MEDIO	CONTROL ALTO
1	43	227	982
2	44	237	1014
3	53	235	1016
4	52	264	974
5	60	250	984
6	54	248	979
7	52	242	981
8	49	259	1182
9	49	261	1067
10	45	272	1093
11	52	256	963
12	48	270	1063
13	52	262	1030
14	49	258	1013
15	48	248	975
16	47	244	1047
17	54	258	1047

*Los resultados están dados como microesferas/ μ L.

REACTIVO UTILIZADO:

CONTROLES TruCOUNT (BECTON DICKINSON)

No. de catálogo 340335

Lote. 16052

Fecha de caducidad. 06- Agosto- 2001

VALORES ASIGNADOS POR LA CASA COMERCIAL PARA LAS MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT			
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
\bar{X}	49	251	1009
D.E.	7.9	21.9	65.6

CUADRO No. 14 CUENTA ABSOLUTA DE MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT PARA CD3+/CD8+/CD45+

NO. DE CORRIDA	CONTROL BAJO	CONTROL MEDIO	CONTROL ALTO
1	52	275	968
2	50	242	977
3	58	243	1014
4	54	237	939
5	52	250	965
6	57	239	993
7	57	257	971
8	47	259	978
9	45	278	1036
10	58	253	1053
11	50	263	1077
12	51	268	1077
13	41	286	1115
14	57	255	1039
15	45	258	1096
16	56	270	1065
17	42	272	1070

*Los resultados están dados como microesferas/ μ L.

REACTIVO UTILIZADO:

CONTROLES TruCOUNT (BECTON DICKINSON)

No. de catálogo 340335

Lote. 16052

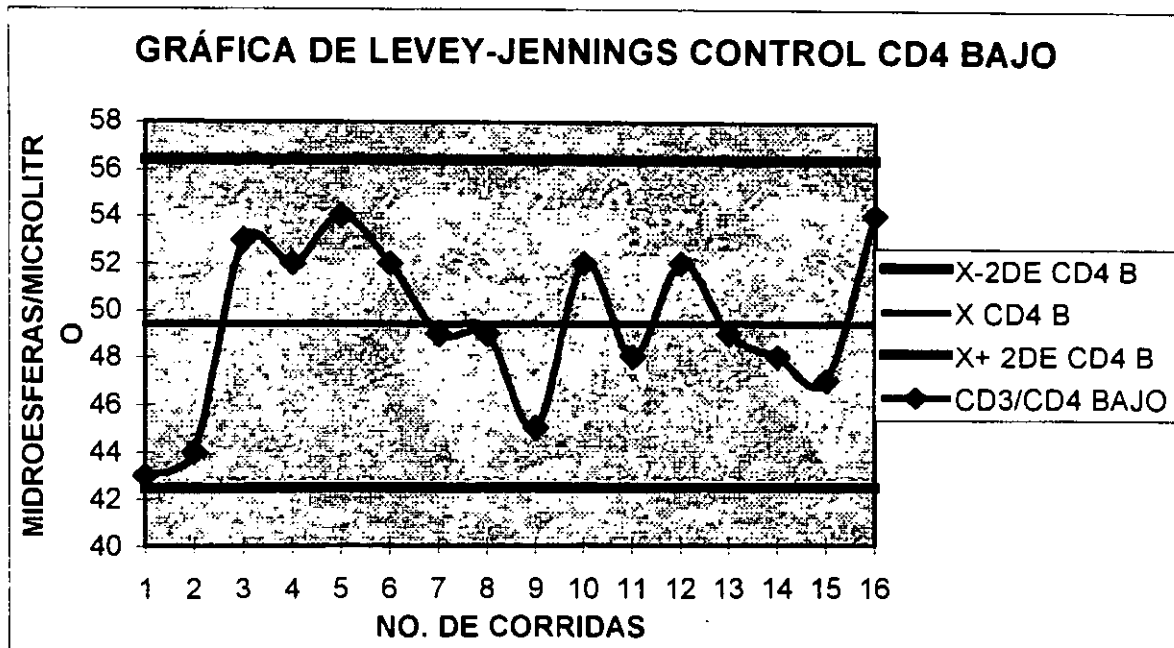
Fecha de caducidad. 06- Agosto- 2001

VALORES ASIGNADOS POR LA CASA COMERCIAL PARA LAS MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT			
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
\bar{X}	49	251	1009
D.E.	7.9	21.9	65.6

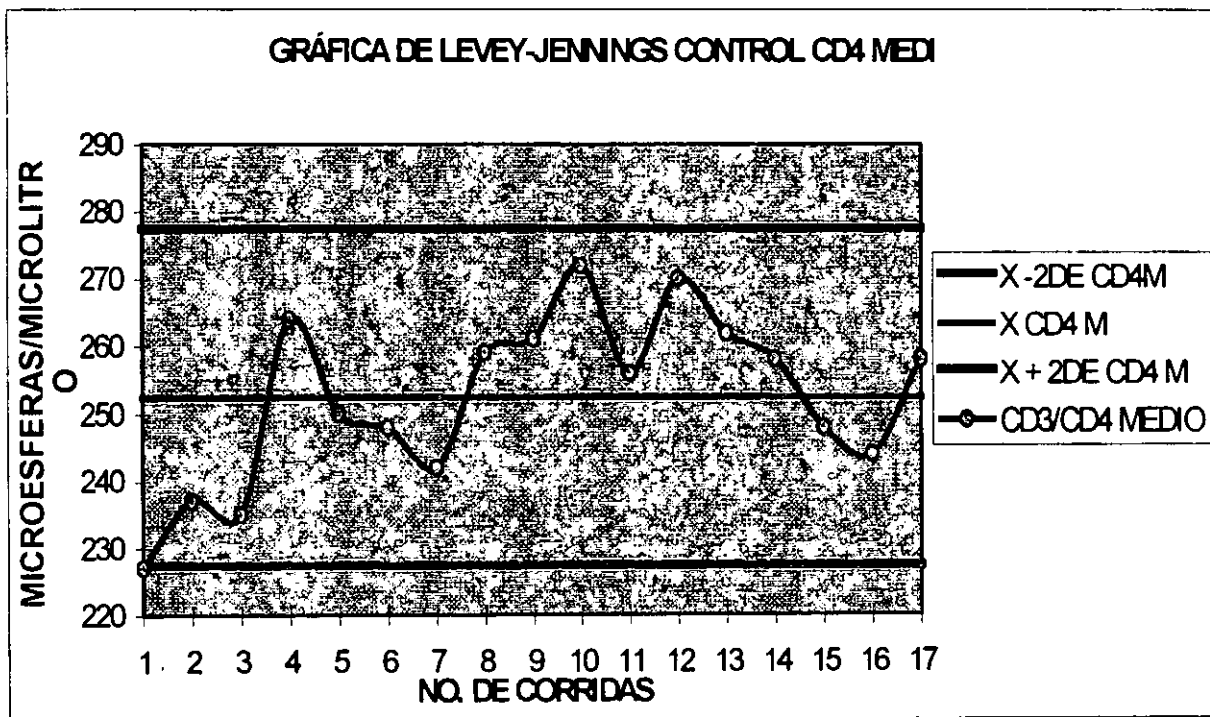
VALORES OBTENIDOS EN EL LABORATORIO PARA LAS MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT EN CD3/CD4/CD45			
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
\bar{X}	49.438	252.412	1014.250
D.E.	3.483	12.555	39.874

VALORES OBTENIDOS EN EL LABORATORIO PARA LAS MICROESFERAS DE CONTROL TruCOUNT EN CD3/CD8/CD45			
	NIVEL BAJO	NIVEL MEDIO	NIVEL ALTO
\bar{X}	51.294	259.118	1025.471
D.E.	5.654	14.361	53.675

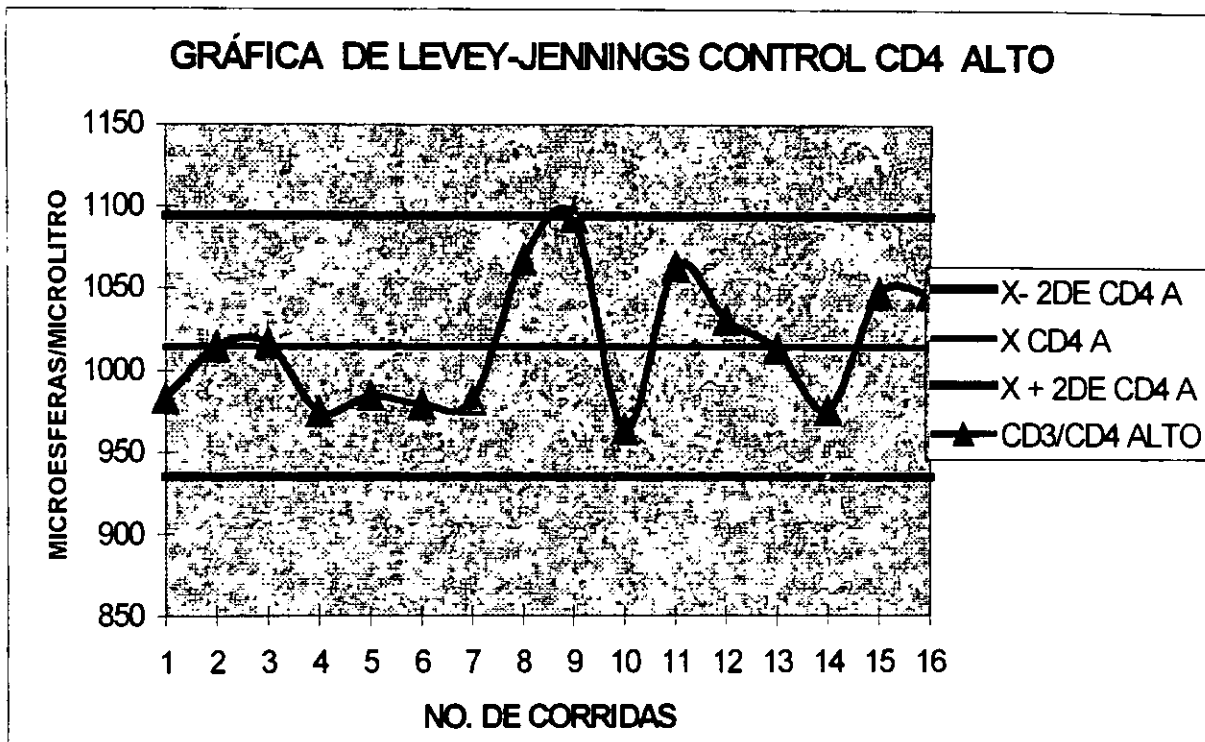
CARTAS DE CONTROL DE CALIDAD (LEVEY-JENNINGS)



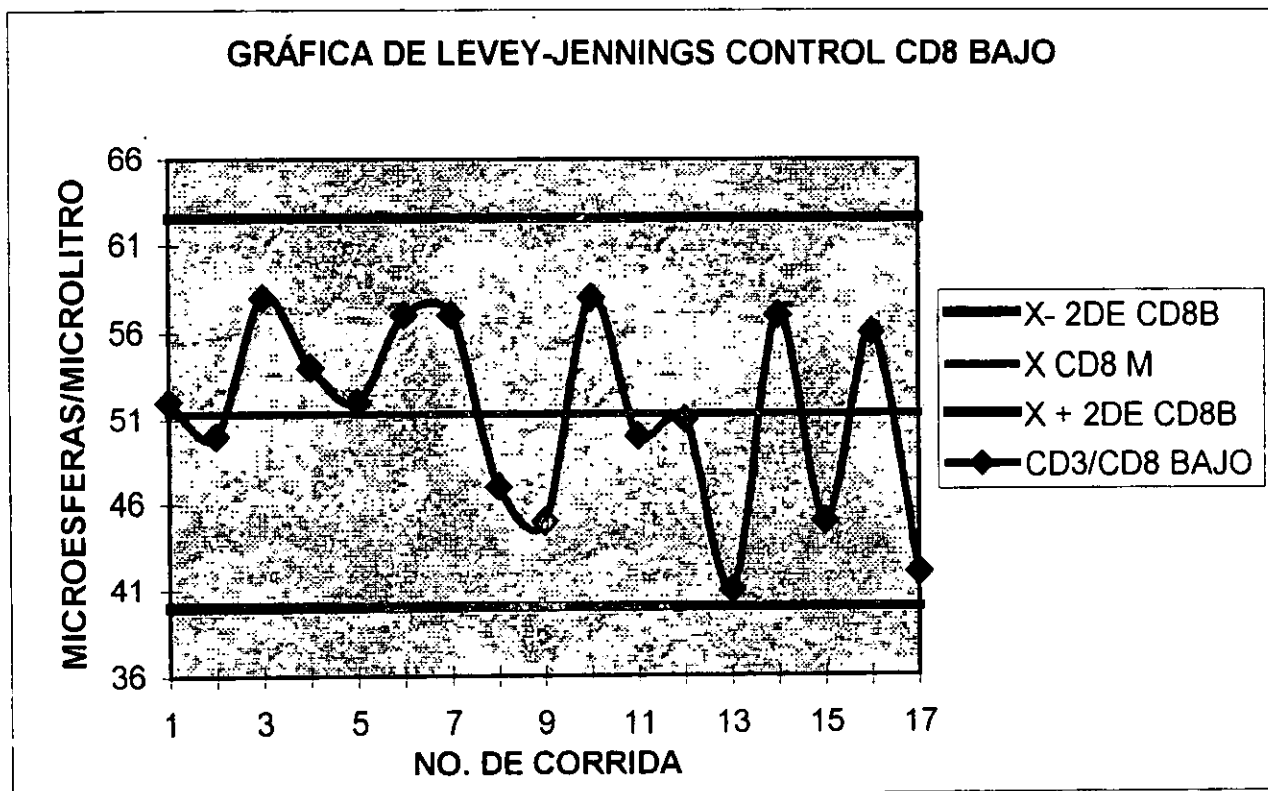
GRÁFICA No. 9



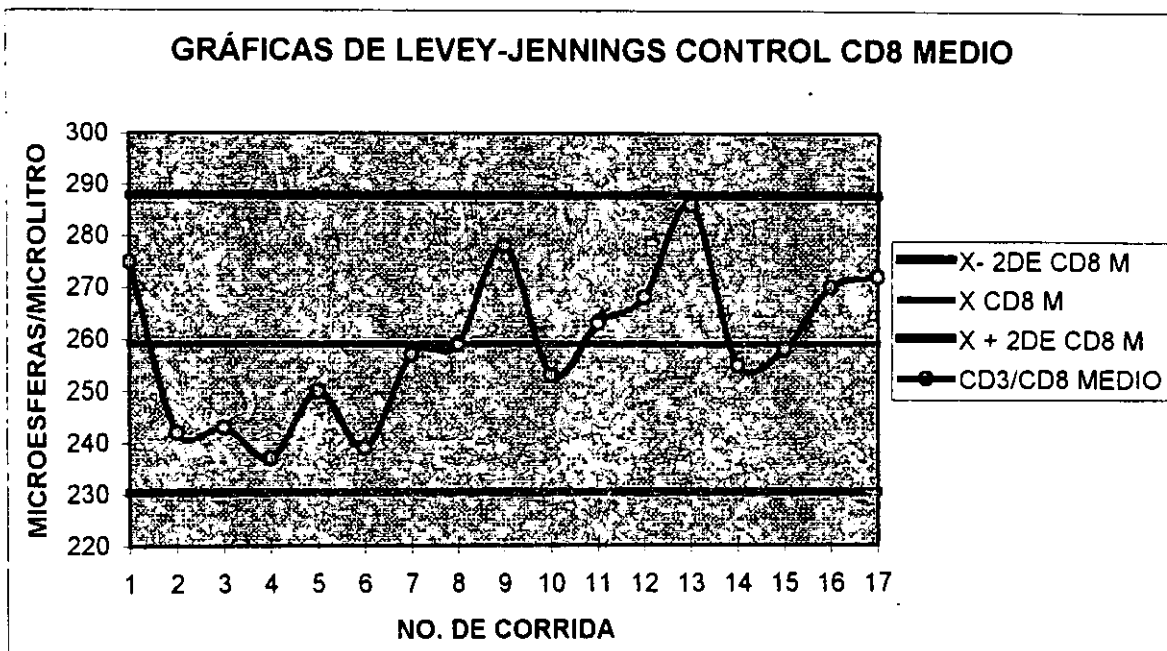
GRÁFICA No. 10



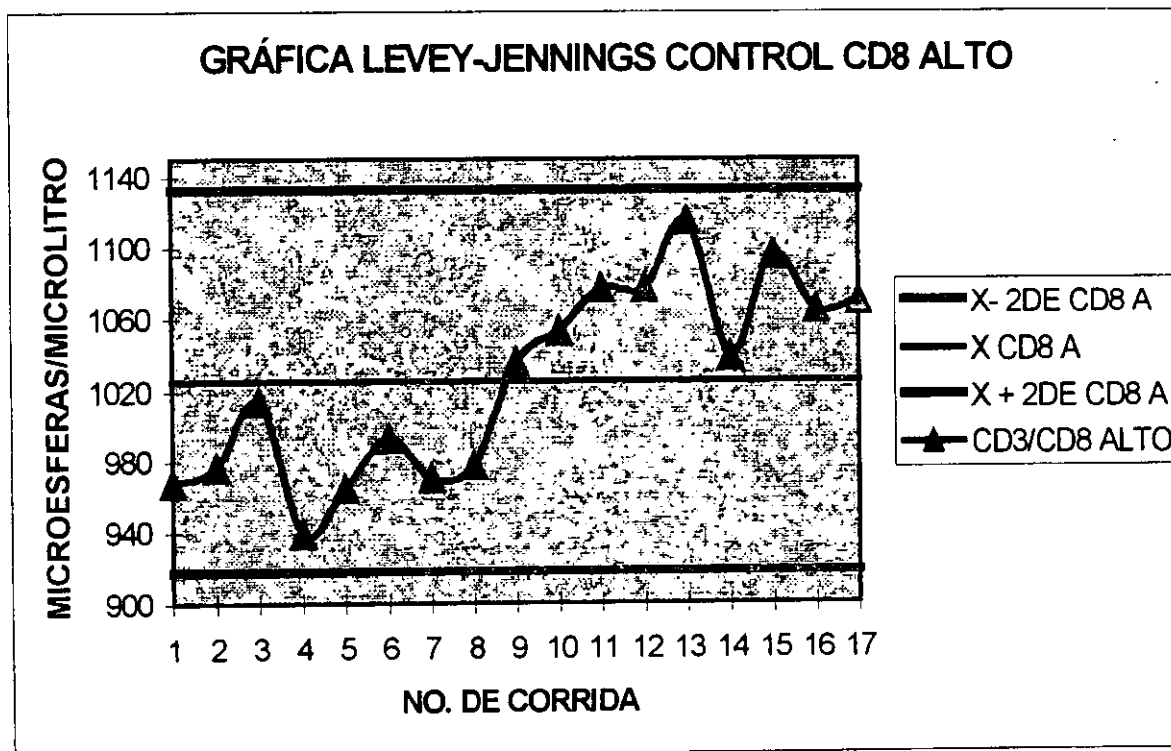
GRÁFICA No. 11



GRÁFICA No. 12



GRÁFICA No. 13



GRÁFICA No. 14

RESULTADOS

En los cuadros No. 1-5; observamos los valores de las subpoblaciones linfocitarias por intervalos de edad representados por sus medidas de tendencia central con la media y la mediana y como medidas de tendencia de dispersión con el rango y la desviación estándar.

En el cuadro No. 6 se presentan los intervalos de confianza por cada rango de edad utilizando la mediana y los valores de los percentiles P25 y P75.

En el cuadro No. 7 se presentan los valores obtenidos para cada subpoblación linfocitaria del análisis de varianza (ANOVA), y aplicando la prueba F (Fisher) las probabilidades ($p < 0.05$) son estadísticamente significativas para un nivel de confianza $\alpha = 95\%$; así como los coeficientes de correlación (R, R^2) admiten una buena asociación entre las variables dependientes (subpoblaciones linfocitarias) y las independientes (rangos de edad) para curvas con regresión polinomial (no paramétricas; gráficas de la 1 a la 8). Los límites de confianza se establecieron con los percentiles P25 y P75, sobre la mediana como medida de tendencia central. Se observa, así mismo que los rangos de edades entre 0-9 y 51-78 años, lo recomendable es aumentar el tamaño de la muestra para ajustar la dispersión mostrada.

En los cuadros No. 8 y 9 se representan las subpoblaciones linfocitarias ahora agrupadas por sexo (femenino y masculino) representados por sus medidas de tendencia central con la media y la mediana y como medidas de tendencia de dispersión con el rango y la desviación estándar.

En el cuadro No. 10 se observa la aplicación de una prueba de Hipótesis t std. para comparar los valores promedio de cada subpoblación linfocitaria, encontrando diferencias significativas ($p < 0.001$) entre ambos sexos.

En el cuadro 11 se presenta los valores obtenidos para las subpoblaciones linfocitarias para la población mexicana en general (hombres y mujeres) representados por sus medidas de tendencia central con la media y la mediana y como medidas de tendencia de dispersión con el rango y la desviación estándar.

En el cuadro 12 se observa la aplicación de una prueba de Hipótesis t std. para comparar los valores promedio de cada subpoblación linfocitaria, en la muestra representativa de la población de mexicanos con poblaciones de caucásicos y árabes; Encontrando diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las diferentes razas.

En los resultados del material de control. La varianza en condiciones de rutina con valores conocidos se presentan en los cuadros 13 y 14. De las gráficas 9 a 12 se presentan las cartas control Levey-Jennings; se observa la distribución de los valores de las suspensiones de microesferas control bajo, medio y alto para CD4 y CD8 sobre los valores promedio ± 2 D.E.. En ningún caso salen los puntos fuera de los límites establecidos.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue realizado para determinar el número absoluto y relativo de las subpoblaciones linfocitarias de la población de derechoabientes del C.M.N 20 DE NOV., para establecer los rangos de referencia del laboratorio, pues se sabe de lo necesario que es contar con los valores propios de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, para poder establecer en forma acertada el "status" inmunológico de los pacientes. No sólo la enfermedad por sí misma tiene influencia sobre el inmunofenotipo, sino que una gran variedad de factores técnicos y biológicos que pueden afectar los resultados. Dentro de las variables biológicas se han considerado principalmente: el sexo, edad, raza, niveles de estrés, tabaquismo; dentro de las variables técnicas: método de preparación de las células, anticoagulante empleado, características de los anticuerpos empleados, así como el modelo del citómetro utilizado. Con ello el estudio consideró únicamente a individuos sanos los cuales fueron elegidos de donadores del banco de sangre, así como posibles candidatos a donadores de órganos y médula ósea para trasplante; los cuales presentaron serología infecciosa negativa (HIV, HCV, AgHBs y SIFILIS), así como un resultado de su valoración clínica aceptable. Para este estudio no se consideraron otros factores como son el nivel de estrés, tabaquismo. Para minimizar los factores técnicos todas las muestras fueron procesadas en un lapso menor a 5 horas después de haberse tomado la muestra, se empleo el mismo citómetro de flujo (FACS calibur) a través de todo el estudio; Así como el procesamiento y manipulación de las muestras fue realizada por una misma persona durante todo el estudio, finalmente todos los anticuerpos monoclonales, tubos para la preparación de muestras (tubos Trucount), solución lisante fueron de la casa comercial Becton Dickinson para eliminar aun más las variaciones tecnológicas.

Para la obtención de datos confiables, en este trabajo se utilizaron los controles de calidad recomendados por la casa comercial; con la elaboración de cartas control Levey-Jennings. Conjuntamente se aplicó el método mejor establecido para preparar las células (sangre completa /lisando-no lavado), se emplearon las combinaciones de anticuerpos recomendadas en la literatura, se realizó el análisis de datos y se presentan en la forma propuesta por diversos autores.

Es importante mencionar que las que las variaciones inherentes a la raza no han sido estudiadas con profundidad en nuestro medio, la mayoría de los estudios se han realizado en caucásicos y en afro-americanos, aunque también hay reportes en Asiáticos, por lo anterior es necesario realizar más estudios en hispanos - americanos.

Un factor biológico considerado de importancia en el estudio de las subpoblaciones de linfocitos, es la edad, por lo que se deben realizar más estudios para identificar las diferencias relacionadas con ella, en nuestro caso se aprovechó la afluencia de derechoabientes del hospital para realizar el estudio de la población. De lo que se encontró que durante la primera etapa de vida el recuento de los leucocitos totales y los linfocitos de la sangre es más alto al nacer y declina con la edad; esto es debido a que el sistema inmune durante los primeros años de vida encuentra muchos antígenos, los cuales justamente inducen una activación masiva, proliferación y procesos de maduración. Esos procesos continúan hasta alcanzar niveles suficientemente útiles para reconocerlos y alcanzar una respuesta de memoria. La proporción de las subpoblaciones linfocitarias varía, pero el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ presenta un aumento progresivo con el paso del tiempo, éste sería el comportamiento idóneo en cualquier población más sin embargo se encontró que en la población mexicana hay una

ligera caída en los intervalos de edad de 0-9 y 51-78 años en los cuales se observa que en lugar de que aumenten las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+, éstas disminuyen; esto se debió principalmente al tamaño de la muestra (n=8 y n=19) lo que provocó que se presentara una gran dispersión de los datos de estos intervalos de edad con respecto de los otros intervalos que presentan un comportamiento esperado. Al presentarse una disminución de subpoblaciones se obtuvo un aumento en la relación CD4+/CD8+.

Debido a que el género es también otra fuente de variabilidad, la muestra se integró con un número muy parecido de mujeres y hombres, se encontró que hay diferencias entre los porcentajes de linfocitos T, el que fue mayor en el caso de las mujeres ($p < 0.001$). Observándose también diferencias en las células CD4+, CD8 y la relación CD4/CD8.

Los datos obtenidos en el presente estudio son diferentes a los establecidos previamente para caucásicos (24) y para árabes (26) los porcentajes delimitados en este estudio indican diferencias significativas entre esos trabajos y los obtenidos en el presente estudio, con valores menores en las células T y las subpoblaciones linfocitarias, además de un aumento en la relación CD4+/CD8+. Los porcentajes obtenidos para la población de derechoabientes del Hospital C.M.N. 20 de NOV. indican que en la distribución de linfocitos y sus respectivas subpoblaciones hay diferencias, que pueden estar relacionadas con la raza.

Las aplicaciones del estudio de las subpoblaciones tanto en la clínica como en la investigación básica han evolucionado muy rápidamente durante los últimos años, dentro de los aspectos importantes que han propiciado este desarrollo cabe mencionar: 1) Se cuenta en la actualidad con citómetro de flujo cuyo manejo es relativamente simple; 2) Existen en el mercado una amplia variedad de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para realizar el análisis directo de inmunofluorescencia; 3) Se han perfeccionado los análisis, para eliminar probables fuentes de error, un ejemplo representativo de esto es que se ha superado la imprecisión que se tenía en el análisis del inmunofenotipo empleando un solo color, ahora, se pueden identificar dos poblaciones simultáneamente, empleando dos anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos e incluso recientemente se ha implementado el análisis de tres colores, con tres anticuerpos y colorantes fluorescentes diferentes.

Por lo anterior cada día se tiene mayor información con relación a la función de las diferentes poblaciones de linfocitos y ello ha permitido conocer mejor sus interacciones e identificar nuevos marcadores con valor diagnóstico y pronóstico.

El contar con valores de referencia permitirá establecer las posibles alteraciones en una gran diversidad de condiciones y padecimientos. También el contar con cifras representativas para nuestra población, puede ser muy útil para evaluar el estado inmunológico en diferentes tipos de enfermedades, para elegir tratamientos específicos, para determinar la eficiencia de los mismos e inclusive para lograr proponer tratamientos alternativos.

CONCLUSIONES

- Se cuantificaron en derechohabientes sanos del C.M.N. 20 DE NOV. , las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 estableciéndose los rangos propios del laboratorio y la población que asiste a atención médica al nosocomio, para con ello contar con una referencia más verdadera del estado inmunológico de cada paciente y poderle brindar un tratamiento más adecuado o en su defecto diagnosticarle un mal funcionamiento de su sistema inmunológico oportunamente.
- Al determinar en cada grupo de estudio las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8, se observó que éstas presentan un comportamiento de funciones no paramétrica (Distribución polinomial); observando una diferencia estadísticamente significativa entre cada intervalo de edad; por lo anterior podemos inferir que los cambios ocurridos en los niveles de las diferentes subpoblaciones linfocitarias están asociadas a la edad; por esta razón es importante establecer los valores de referencia jerarquizando por intervalo de edad.
- De los resultados obtenidos de la población mexicana en general se llega a la conclusión que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a otras poblaciones con características étnicas distintas a nuestra muestra de estudio; como es el caso de la población árabe y caucásica; de ello que se observe una afectación de los resultados por variables como la raza y la situación geográfica, por lo que no es válido valorar a un paciente con base en datos de valores de referencia de subpoblaciones de linfocitos extranjeros.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que el personal de laboratorio clínico este en estrecho contacto con el personal médico para poderle proporcionar los valores de referencia adecuados para cada subpoblación y grupo de edad, esto es con el fin de que la valoración del estado inmunológico del paciente sea adecuada y no se cometan errores por el hecho de utilizar los rangos poblacionales en general; si se utilizan así se corre el riesgo de tener un mal diagnóstico de la salud del paciente; al igual que la aplicación de un mal tratamiento que puede terminar en secuelas graves para el paciente.
- Así también se recomienda que al momento de utilizar el equipo de citometría de flujo, se tenga el suficiente cuidado para la realización de las pruebas, pues se corre el riesgo de que si estas no son bien mezcladas, las células se queden el fondo del tubo. De igual manera se debe de tener cuidado que el rayo láser este funcionando en optimas condiciones para evitar arrastre o disminución de la concentración celular.
- Otro punto determinante que se debe cuidar es que la conservación y manejo de los reactivos así como los controles sea; adecuada y la recomendada por la casa comercial, de igual forma se debe de tomar en cuenta la elección correcta de los anticuerpos monoclonales para asegurar la óptima identificación de cada estirpe linfocitaria.
- En aquellos intervalos de edad de edad (0 a 9 y 52 a 78) donde las muestras son pequeñas, es recomendable aumentar el tamaño de las mismas con el objeto de apoyar los resultados obtenidos y verificar si las diferencias establecidas son confiables.
- Se tiene que prestar importancia a que las subpoblaciones de linfocitos no solo están integradas por linfocitos CD4 y CD8 (Cel. T cooperadores y citotóxicos), sino que también se presentan linfocitos B y Cel. NK, los cuales deben ser valorados para tener una visión completa del estado inmunológico del paciente. Por lo que queda abierta la opción de poder llevar acabo la valoración de estas subpoblaciones en derecho habientes sanos de C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE, y completar este estudio para poder contar con todos los rangos de referencia de cada una de las subpoblaciones y cada grupo de edad.

Solución Lisante FACS (Concentrada 10X)

La solución lisante FACS de Becton Dickinson Immunocytometry (BDIS) se usa en la lisis de glóbulos rojos después de la tinción de inmunofluorescencia directa de las células de sangre humana periférica con anticuerpos monoclonales que se realiza antes del análisis por citometría de flujo.

Principio del procedimiento.

Cuando se agrega sangre entera al reactivo de anticuerpos monoclonales, los anticuerpos conjugados con fluorocromos del reactivo se unen de forma específica a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Las muestras teñidas se tratan entonces con la solución lisante FCAS para producir la lisis de los glóbulos rojos en condiciones hipotónicas suaves al mismo tiempo que se conservan los leucocitos.

Reactivo suministrado.

La solución lisante FACS concentrada 10X se presenta como 100 mL de una solución tamponada, que está patentada, y que contiene < 15% de formaldehído y < 50% de dietilenglicol.

Instrucciones para diluir.

Diluir la concentración 10X, al 1:10 con agua desionizada que esté a temperatura ambiente (20° a 25° C). La solución que se obtiene es estable durante un mes cuando se almacena en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.

Almacenamiento y manipulación.

La solución lisante FACS (10X) es estable por el período que se indica en la etiqueta cuando se almacena según se indica en las instrucciones. Este reactivo no se debe usar si cambia de color o se forma un precipitado.

Precauciones.

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. **ADVERTENCIA:** El reactivo contiene dietilenglicol y formaldehído. El formaldehído es dañino si se inhala, entra en contacto con la piel o se ingiere. Irrita los ojos y la piel. La exposición puede causar cáncer. Existen riesgos posible de efectos irreversibles. El contacto con la piel puede causar sensibilización. Se debe almacenar bajo llave y fuera del alcance de los niños. Se debe mantener alejado de los alimentos, bebidas y alimentos para animales. El dietilenglicol, aún en cantidades pequeñas, puede ser fatal. Si se ingiere, obtenga atención médica de inmediato y muestre el envase o etiqueta. Se debe desechar de acuerdo con las normas federales, estatales o locales.

Microesferas CaliBRITE

Para preparar el citómetro, antes de su uso se utiliza una suspensión de microesferas CaliBRITE sin marcar para establecer los ajustes de voltajes de los tubos fotomultiplicadores. Se obtiene una cantidad de datos suficiente para poder fijar una ventana de FCS que aisle los eventos debidos a microesferas aisladas de los eventos debidos a residuos y microesferas agregadas. Luego se ajustan los voltajes de los PTM para fluorescencia hasta que los valores medios para las microesferas fluorescentes en los canales correspondan a los valores deseados. EL voltaje del PMT para la SSC se ajusta de tal modo que las microesferas queden en posición en el canal de SSC deseado. El umbral FCS se ajusta a un nivel que disminuya al mínimo la señal de fondo (cuando hay señal de fondo).

Después se prepara una suspensión con cantidades iguales de las microesferas CaliBRITE, que se usa para ajustar la compensación de la fluorescencia. En la configuración del instrumento usando dos colores, los ajustes de compensación de la fluorescencia son FL1-%FL2 y FL2-%FL1.

Además, en algunas aplicaciones de tres colores, los ajustes de compensación de la fluorescencia son FL3-%FL2. (Debido a que el PTM FL2 no detecta PerCP, no es necesaria la compensación FL2-%FL3).

Estos ajustes corrigen la superposición de los espectros desplazado las poblaciones marcadas para que queden alineadas con las correspondientes poblaciones de microesferas sin marcar.

La prueba de sensibilidad se lleva a cabo con la suspensión de microesferas mezcladas adecuadamente, usando el instrumento con los ajustes de los PTM y de la compensación.

Reactivo suministrado.

Los juegos de microesferas CaliBRITE contienen viales individuales de microesferas de polimetilmetacrilato de aproximadamente 6µm: 2.5 ml de microesferas sin marcar, 2.5 ml de microesferas marcadas con FITC y 1.25 ml de microesferas marcadas con PE (y si corresponde, 1.5 ml de microesferas marcadas con PerCP). Todas las microesferas vienen en solución fisiológica tamponada y estabilizada, que contiene gelatina y azida de sodio al 0.1%.

Procedimiento.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- 1.- Tubos de ensayo Falcon de poliestireno, de 12 x 75 mm, desechables, con tapa.
- 2.- Micropipeteador con pipetas con punta.
- 3.- Líquido de recubrimiento.

Preparación de las suspensiones de prueba.

Preparación de los tubos A y B (ver a continuación). Todas las suspensiones se prepararan inmediatamente antes de su uso. Mezclar suavemente todos los viales de microesferas, ya sea por inversión o en un agitador vórtex antes de su uso. Invertir el vial con microesferas completamente antes de agregar la gota al tubo. La gota debe tener un aspecto turbio, lo cual indica que las microesferas están bien mezcladas. Asegurarse de obtener una gota completa. Mantener las suspensiones de microesferas sobre hielo o entre 2° y 8° C y protegidas de la luz directa en todo momento. Las microesferas diluidas permanecen estables durante 8 horas si se conservan en la

obscuridad entre 2° y 8° C. Si se incluyen las microesferas marcadas con PerCP, la estabilidad, entre 2° y 8° C, es de una hora.

Tubo A

Para procedimiento de dos y tres colores.

Se prepara en un tubo una suspensión de microesferas sin marcar agregando una gota de reactivo de microesferas sin marcar a 1 ml de líquido de recubrimiento FACSFlow. Rotulado como "Tubo A" y usarlo para ajustar los tubos fotomultiplicadores.

Tubo B

Para procedimientos de tres colores:

Se prepara en tubo una suspensión de una mezcla de microesferas agregando una gota de cada uno de los cuatro tipos de microesferas (sin marcar, FITC, PE y PerCP) a 3 ml de líquido de recubrimiento FACSFlow. Rotularlo como "Tubo B" y usarlo para el ajuste de la compensación de la fluorescencia y la determinación de la sensibilidad.

Precauciones.

- 1.- Para uso diagnóstico in vitro.
- 2.- No usar después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
- 3.- Las microesferas diluidas son estables durante 8 horas si se conservan en la obscuridad entre 2° y 8°C. Si se diluyen la microesferas marcadas con PerCP, la estabilidad, entre 2° y 8°C, es de una hora. Si se usan las microesferas después del período en que son estables, se empieza a notar una disminución de la separación entre las poblaciones marcadas y sin marcar, que resulta en una falla en la prueba de sensibilidad.
- 4.- La separación entre las señales de fluorescencia puede disminuir hasta 2.5 canales por mes, como resultado del envejecimiento de las microesferas.
- 5.- No congelar las microesferas ni exponerlas a la luz directa durante su almacenamiento o uso.
- 6.- Los reactivos contienen azida de sodio como agente conservante. Sin embargo, se debe tener cuidado de evitar contaminación bacteriana, que pueda producir resultados erróneos.
- 7.- Los cambios excesivos en los resultados podrían indicar que las microesferas se han deteriorado o que las condiciones del instrumento han cambiando. Si se sospecha que se han deteriorado las microesferas se debe usar una suspensión nueva y/o verificar las condiciones del instrumento.
- 8.- ATENCION: las microesferas CaliBRITE se deben diluir usando solamente el líquido de recubrimiento FACSFlow.

TriTEST CD3 FICT/CD8 PE/ CD45 PerCP

El TriTEST CD3 conjugado a isocianato de fluoresceína (FICT)/CD8 conjugado a ficoeritrina (PE)/ CD45 conjugado a proteína peridín clorofila (PerCP) de Becton Dickinson Immunocytometry System (BDIS) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de tres colores para la identificación y determinación de los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos T maduros (CD3+), y las subpoblaciones de linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+ CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se utiliza con los tubos TruCOUNT, estas poblaciones se pueden enumerar en un solo tubo.

Aplicaciones clínicas.

Los linfocitos Supresores/citotóxicos son una subpoblación de linfocitos T (CD3+) que son CD8+. Los recuentos de CD3+ CD8+ se pueden utilizar para caracterizar y hacer el seguimiento de ciertas inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes.

Los valores de linfocitos supresores/citotóxicos pueden estar fuera del rango normal de referencia en algunas enfermedades autoinmunes. El porcentaje relativo de la subpoblación CD8+ está aumentada en muchos pacientes con inmunodeficiencia sea congénita o adquirida, tales como inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Principios del procedimiento.

Cuando se añade sangre entera al reactivo, los anticuerpos marcados con fluorocromos del reactivo se unen en forma específica a los antígenos de superficie de leucocitos. Durante la adquisición, las células pasan a través del haz de láser, dispersan la luz láser y las células teñidas fluorescen. Estas señales de dispersión de la luz y de fluorescencia son detectadas por el instrumento y dan información sobre el tamaño de las células, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos TriTEST utilizan la fluorescencia para seleccionar la población linfocitaria, lo que permite establecer ventanas de fluorescencia directamente para estas células y reducir así en la ventana la contaminación con glóbulos rojos de la sangre nucleados o sin lisar.

Cuando se usa un tubo TruCOUNT, se tiñe un volumen conocido de la muestra directamente en el tubo. El sedimento liofilizado del tubo se disuelve, liberando un número conocido de microesferas fluorescentes. El número absoluto (células/ μ L) de células positivas en la muestra se puede obtener dividiendo el número de eventos de células positivas entre el número de eventos de microesferas fluorescentes, y luego se multiplica por la concentración de microesferas.

Reactivo suministrado, suficiente para 50 pruebas.

El reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45 de BDIS, suficiente para 50 pruebas, se suministra en 1 ml de solución salina tamponada que contiene seroalbúmina bovina y azida de sodio al 0.1%. Contiene Ac anti-CD3 marcado con FITC, clon SK7, Ac anti-CD8 marcado con FITC, clon SK1 y Ac anti-CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (Hle-1).

El Ac monoclonal anti-CD3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo CD3, que está unido al receptor de antígeno de las células T (TCR). Este

complejo está formado por lo menos por seis proteínas con un peso molecular que varía entre 20 y 30 kilodaltones (kDa). El antígeno reconocido por los anticuerpos anti-CD3 está asociado en forma no covalente con el TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).

El Ac monoclonal anti-CD8 identifica linfocitos T supresores/citotóxico y reconoce un antígeno expresado en la subunidad- α de 32kDa del antígeno CD8, unida por un puente disulfuro. El dominio citoplasmático de la subunidad- α del antígeno CD8 está asociado con la proteína tirosina quinasa p56. La molécula de CD8 interactúa con moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) lo cual resulta en un aumento de la adhesión entre los linfocitos T CD8+ y las células blanco. La unión de la molécula CD8 a las moléculas MHC de clase I produce la activación de los linfocitos T que están en reposo.

El Ac monoclonal CD45 identifica los leucocitos reconoce un antígeno de leucocito humano de 180 a 220 kDa que es miembro de la familia de los antígenos comunes de los leucocitos(LCA). Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD45 están compuestos de cadena pesada $\gamma 1$ y cadenas ligeras kappa de ratón.

Precauciones.

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Si se usan los tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se añada sea exacto. Las pipetas deben estar calibradas para dispensar exactamente 50 μ L de la muestra. Se recomienda utilizar una pipeta electrónica que se opere en la modalidad inversa. Si no se usa este tipo de pipeta o un similar, se debe utilizar la técnica de pipeteo inverso.
3. Los recuentos de microesferas en los tubos TruCOUNT varían según los lotes. Es crítico usar el recuento de microesferas del lote de tubos TruCOUNT que se esté utilizando. No se deben mezclar varios lotes de tubos en la misma prueba. Almacenar los tubos TruCOUNT en sus bolsitas originales a temperaturas entre 2° y 25° C. Para evitar la posible condensación, la bolsita se debe abrir solamente después de haber sacado tubo. Se debe examinar el desecante cada vez que se abra la bolsita. Si el desecante ha cambiado de color azul a violeta, se debe desechar el resto de tubos. Los tubos se deben de usar dentro de la hora de haberlos sacado de la bolsita y no se deben usar más allá de la fecha de caducidad indicada en el envase.
4. El reactivo se debe almacenar entre 2° y 8°C. No se debe usar después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
5. El reactivo no se debe usar si se nota cualquier cambio en el aspecto. La precipitación o cambio de color indican inestabilidad y deterioro.
6. El reactivo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las células. El vial del reactivo se debe mantener seco.
7. Aunque el reactivo de anticuerpo contiene azida de sodio como agente conservante, se debe manejar con cuidado para evitar la contaminación bacteriana que podría causar resultados erróneos.
8. **ADVERTENCIA:** Todas las muestras biológicas y los materiales con que se estén en contacto se deben considerar riesgos biológicos, manipularse como si fueren capaces de transmitir infecciones y desecharse con todas las precauciones adecuadas de acuerdo con los reglamentos federales, estatales y locales. Nunca se debe pipetear con la boca. Se debe usar ropa y guantes protectores adecuados. Se ha informado que la fijación inactiva el VIH.

PROCEDIMIENTO

Recolección y preparación de la muestra.

La obtención de la sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa en un tubo de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA (tapón lila), El reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45, y los tubos TruCOUNT han sido validados con las fórmulas líquida y sólida de K3 EDTA. Para este procedimiento se requiere un mínimo de 100 µl de sangre entera. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante del tubo sobre el volumen mínimo de sangre que se debe obtener para asegurar un uso adecuado.

Se debe obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) y un recuento diferencial de la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para estar seguros de que el recuento de WBC está dentro del rango lineal .

La sangre anticoagulada y almacenada a temperatura ambiente (20° a 25° C) se debe de teñir dentro de las 48 horas de obtenida la muestra y luego se debe de analizar dentro de las 6 horas de haber sido teñida. Si las muestras se tiñen dentro de las 24 horas de obtenidas, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones que interfieren

No se deben usar muestras de pacientes que hayan sido fijadas y almacenadas previamente. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados erróneos. Las muestras obtenidas de pacientes que estén recibiendo medicamentos inmunosupresores pueden tener una resolución pobre. Los blastocitos pueden interferir con los resultados de la prueba. Las muestras con hemólisis se deben desechar.

El reactivo TriTEST CD 3/CD4/CD45 y el reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45 no ha sido validado para ser usado con heparina o dextrosa de ácido cítrico (ACD) líquida como anticoagulantes en la determinación de recuentos absolutos con tubos TruCOUNT.

Reactivo suministrado.

TriTEST CD3 FITC/ CD8 PE/ CD45 PerCP con tubos TruCOUNT (Becton Dickinson, No. de catálogo 340402)

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- 1.- Microesferas CaliBRITE 3 (Becton Dickinson No. de catálogo 340402).
- 2.- Solución lisante FACS (10X), 100 ml Becton Dickinson, No. de catálogo 349202). Las instrucciones para diluir y las advertencias están en el folleto de instrucciones de la solución lisante FACS.
- 3.- Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
- 4.- Tubos VACUTAINER K3 EDTA para recolección de sangre (Becton Dickinson, No. de catálogo 6457) o equivalente.
- 5.- Tubos de pruebas desechables con tapa de poliestireno Falcon de 12 x 75 mm (Becton Dickinson No. de catálogo 2058) o equivalente.
- 6.- Agitador Vortex.

- 7.- Micropipeta con puntas (Pipeta electrónica BD, Becton Dickinson No. de catálogo 34013290; pipetman Rainin Instrument Co., Inc. o equivalente).
- 8.- Dispensador o pipeta de 450 µl para dispensar la solución lisante FACS.
- 9.- Líquido de revestimiento (FACSFlow Becton Dickinson, No. de Catálogo 340398 (E.E. Y Latinoamérica) o 342003), o equivalente.

Tinción de las células.

Después de la tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (20° a 25° C).

Pipeteo inverso

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD o una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos topes de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se aspira al soltar el botón y se expelle al volver a presionar hasta el primer tope.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expelle un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer tope, dejando el exceso de muestra en la punta.

Tinción.

1. Para cada muestra de paciente, se debe rotular un tubo de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra.
Para recuentos absolutos, se debe rotular un tubo TruCount en lugar del tubo de 12 x 75 mm.
NOTA: Antes de usarlo, verifique que el sedimento de microesferas del TruCOUNT esté intacto y dentro del retenedor de metal al fondo del tubo. Si no es así, deseche el tubo TruCOUNT y réplacelo con otro.
2. Pipetar 20 µl del reactivo TRiTEST CD3/CD4/CD45 al fondo del tubo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.
3. Pipetar 50 µl de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo del tubo.
NOTA: Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor.
4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25° C).
5. Anadir 450 µl de solución lisante FACS 1X al tubo.
6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle, Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está ahora lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo.

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°).

Agitar las células suavemente en el Vortex (a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.

Adquirir y analizar los datos en la modalidad de lista con el software MultiSET. Antes de la adquisición de las muestras, se debe de ajustar el umbral para minimizar la presencia de restos y asegurar que las poblaciones que interesan estén incluidas.

Resultados.

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como el número de células positivas por microlito de sangre (recuento absoluto).

TriTEST CD3 FICT/CD4 PE/ CD45 PerCP

El TriTEST CD3 conjugado a isocianato de fluoresceína (FICT)/CD4 conjugado a ficoeritrina (PE)/ CD45 conjugado a proteína peridín clorofila (PerCP) de Becton Dickinson Immunocytometry System (BDIS) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de tres colores para la identificación y determinación de los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos T maduros (CD3+), y las subpoblaciones de linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3+ CD8+) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se utiliza con los tubos TruCOUNT, estas poblaciones se pueden enumerar en un solo tubo.

Aplicaciones clínicas.

Los linfocitos colaboradores/inductores son una subpoblación de los linfocitos T (CD3+) que son a su vez CD4+. Los recuentos de CD3+ CD4+ se pueden utilizar y hacer el seguimiento de ciertas inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes. Los recuentos de los linfocitos T colaboradores/inductores pueden ser útiles en el seguimiento de los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los individuos con VIH típicamente tienen una disminución constante del recuento de linfocitos T colaboradores/inductores conforme progresa la infección.

El reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45 permite identificar los linfocitos colaboradores/inductores T y enumerarlos por separado, excluyendo la posible contaminación con monocitos CD3-CD4+.

Principios del procedimiento.

Cuando se añade sangre entera al reactivo, los anticuerpos marcados con fluorocromos del reactivo se unen en forma específica a los antígenos de superficie de leucocitos. Durante la adquisición, las células pasan a través del haz de láser, dispersan la luz láser y las células teñidas fluorescen. Estas señales de dispersión de la luz y de fluorescencia son detectadas por el instrumento y dan información sobre el tamaño de las células, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos TriTEST utilizan la fluorescencia para seleccionar la población linfocitaria, lo que permite establecer ventanas de fluorescencia directamente para estas células y reducir así en la ventana la contaminación con glóbulos rojos de la sangre nucleados o sin lisar.

Cuando se usa un tubo TruCOUNT, se tiñe un volumen conocido de la muestra directamente en el tubo. El sedimento liofilizado del tubo se disuelve, liberando un número conocido de microesferas fluorescentes. El número absoluto (células/ μ L) de células positivas en la muestra se puede obtener dividiendo el número de eventos de células positivas entre el número de eventos de microesferas fluorescentes, y luego se multiplica por la concentración de microesferas.

Reactivo suministrado, suficiente para 50 pruebas.

El reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45 de BDIS, suficiente para 50 pruebas, se suministra en 1 ml de solución salina tamponada que contiene seroalbúmina bovina y azida de sodio al 0.1%. Contiene Ac anti-CD3 marcado con FITC, clon SK7, Ac anti-CD8 marcado con FITC, clon SK1 y Ac anti-CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (Hle-1).

El Ac monoclonal anti-CD3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena épsilon del complejo CD3, que está unido al receptor de antígeno de las células T (TCR). Este complejo está formado por lo menos por seis proteínas con un peso molecular que varía entre 20 y 30 kilodaltones (kDa). El antígeno reconocido por los anticuerpos anti-CD3 está asociado en forma no covalente con el TCR α/β o γ/δ (70 a 90 kDa).

El Ac monoclonal anti-CD4 identifica los linfocitos T colaboradores/inductores y reconoce al antígeno CD4, P.M. 59kDa, el cual interactúa con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y es el receptor principal del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La porción citoplasmática del antígeno está asociada con la proteína tirosina quinasa p56.

El Ac monoclonal CD45 identifica los leucocitos reconoce un antígeno de leucocito humano de 180 a 220 kDa que es miembro de la familia de los antígenos comunes de los leucocitos(LCA). Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD45 están compuestos de cadena pesada γ 1 y cadenas ligeras kappa de ratón.

Precauciones.

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Si se usan los tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se añada sea exacto. Las pipetas deben estar calibradas para dispensar exactamente 50 μ L de la muestra. Se recomienda utilizar una pipeta electrónica que se opere en la modalidad inversa. Si no se usa este tipo de pipeta o un similar, se debe utilizar la técnica de pipeteo inverso.
3. Los recuentos de microesferas en los tubos TruCOUNT varían según los lotes. Es crítico usar el recuento de microesferas del lote de tubos TruCOUNT que se esté utilizando. No se deben mezclar varios lotes de tubos en la misma pruebas. Almacenar los tubos TruCOUNT en sus bolsitas originales a temperaturas entre 2° y 25° C. Para evitar la posible condensación, la bolsita se debe abrir solamente después de haber sacado tubo. Se debe examinar el desecante cada vez que se abra la bolsita. Si el desecante ha cambiado de color azul a violeta, se debe desechar el resto de tubos. Los tubos se deben de usar dentro de la hora de haberlos sacado de la bolsita y no se deben usar más allá de la fecha de caducidad indicada en el envase.
4. El reactivo se debe almacenar entre 2° y 8°C. No se debe usar después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
5. El reactivo no se debe usar si se nota cualquier cambio en el aspecto. La precipitación o cambio de color indican inestabilidad y deterioro.
6. El reactivo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las células. El vial del reactivo se debe mantener seco.
7. Aunque el reactivo de anticuerpo contiene azida de sodio como agente conservante, se debe manejar con cuidado para evitar la contaminación bacteriana que podría causar resultados erróneos.
8. **ADVERTENCIA:** Todas las muestras biológicas y los materiales con que se estén en contacto se deben considerar riesgos biológicos, manipularse como si fueren capaces de transmitir infecciones y desecharse con todas las precauciones adecuadas de acuerdo con los reglamentos federales, estatales y locales. Nunca se debe pipetear con la boca. Se debe usar ropa u guantes protectores adecuados. Se ha informado que la fijación inactiva el VIH.

PROCEDIMIENTO

Recolección y preparación de la muestra.

La obtención de la sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa en un tubo de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA (tapón lila), El reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45, y los tubos TruCOUNT han sido validados con las fórmulas líquida y sólida de K3 EDTA. Para este procedimiento se requiere un mínimo de 100 µl de sangre entera. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante del tubo sobre el volumen mínimo de sangre que se debe obtener para asegurar un uso adecuado.

Se debe obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) y un recuento diferencial de la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para estar seguros de que el recuento de WBC está dentro del rango lineal .

La sangre anticoagulada y almacenada a temperatura ambiente (20° a 25° C) se debe de teñir dentro de las 48 horas de obtenida la muestra y luego se debe de analizar dentro de las 6 horas de haber sido teñida. Si las muestras se tiñen dentro de las 24 horas de obtenidas, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Condiciones que interfieren

No se deben usar muestras de pacientes que hayan sido fijadas y almacenadas previamente. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de la tinción pueden dar resultados erróneos. Las muestras obtenidas de pacientes que estén recibiendo medicamentos inmunosupresores pueden tener una resolución pobre. Los blastocitos pueden interferir con los resultados de la prueba. Las muestras con hemólisis se deben desechar.

El reactivo TriTEST CD 3/CD4/CD45 y el reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45 no ha sido validado para ser usado con heparina o dextrosa de ácido cítrico (ACD) líquida como anticoagulantes en la determinación de recuentos absolutos con tubos TruCOUNT.

Reactivo suministrado

*TriTEST CD3 FITC/ CD4 PE/ CD45 con tubos TruCOUNT (Becton Dickinson, No. de catálogo 340402)

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- 1.- Microesferas CaliBRITE 3 (Becton Dickinson No. de catálogo 340402).
- 2.- Solución lisante FACS (10X), 100 ml Becton Dickinson, No. de catálogo 349202). Las instrucciones para diluir y las advertencias están en el folleto de instrucciones de la solución lisante FACS.
- 3.- Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
- 4.- Tubos VACUTAINER K3 EDTA para recolección de sangre (Becton Dickinson, No. de catálogo 6457) o equivalente.
- 5.- Tubos de pruebas desechables con tapa de poliestireno Falcon de 12 x 75 mm (Becton Dickinson No. de catálogo 2058) o equivalente.
- 6.- Agitador Vortex.

7.- Micropipeta con puntas (Pipeta electrónica BD, Becton Dickinson No. de catálogo 34013290; pipetman Rainin Instrument Co., Inc. o equivalente).

8.- Dispensador o pipeta de 450 μ l para dispensar la solución lisante FACS.

9.- Líquido de revestimiento (FACSFlow. Becton Dickinson, No. de Catálogo 340398 (E.E. Y Latinoamerica) o 342003), o equivalente.

Tinción de las células.

Después de la tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (20° a 25° C).

Pipeteo inverso

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD o una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos toques de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se aspira al soltar el botón y se expelle al volver a presionar hasta el primer tope.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expelle un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer tope, dejando el exceso de muestra en la punta.

Tinción.

1. Para cada muestra de paciente, se debe rotular un tubo de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra.
Para recuentos absolutos, se debe rotular un tubo TruCount en lugar del tubo de 12 x 75 mm.
NOTA: Antes de usarlo, verifique que el sedimento de microesferas del TruCOUNT esté intacto y dentro del retenedor de metal al fondo del tubo. Si no es así, deseche el tubo TruCOUNT y replácelo con otro.
2. Pipetar 20 μ l del reactivo TRiTEST CD3/CD4/CD45 al fondo del tubo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.
3. Pipetar 50 μ l de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo el tubo.
NOTA : Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor.
4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25° C).
5. Anadir 450 μ l de solución lisante FACS IX al tubo.

6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle, Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está ahora lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo.

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°).

Agitar las células suavemente en el Vortex (a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.

Adquirir y analizar los datos en la modalidad de lista con el software MultiSET. Antes de la adquisición de las muestras, se debe de ajustar el umbral para minimizar la presencia de restos y asegurar que las poblaciones que interesan estén incluidas.

Resultados.

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como el número de células positivas por microlito de sangre (recuento absoluto).

Controles TruCOUNT

Uso propuesto

Las microesferas de control TRUCOUNT de Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS) están diseñadas para usarse en diagnóstico in vitro con productos tales como reactivos TriTEST de Becton Dickinson y para los citómetros de flujo con el equipo adecuado, para servir como control de ciertos elementos del proceso de recuentos absolutos. Específicamente, un valor de las microesferas que esté fuera del rango esperado indica un error en el pipeteo o un problema con el valor de recuento absoluto de las microesferas. Las microesferas control TRUCOUNT no intentan substituir un control celular.

Principio del procedimiento.

Las suspensiones de microesferas control bajo, medio y alto son adicionadas a sangre normal preparada con reactivo apropiados usando tubos TRUCOUNT. Si el software es apropiado tal como el MultiSET el control de cuentas de las perlas es realizado por el software en forma automática. Se puede realizar en forma manual usando por ejemplo el software CELL QUEST.

Reactivo.

El reactivo suministrado es suficiente para 30 pruebas.

Precauciones.

1. Para su uso de diagnóstico in vitro.
2. La adición de el volumen preciso de las perlas control es crítica para lograr el resultado. Las pipetas deben ser calibradas para dispensar exactamente 50µL de la muestra. Una pipeta electrónica la cual opera en el modo de pipeteo inverso esta disponible en Becton Dickinson. Si está o una pipeta similar no es usada entonces se debe revisar la técnica de pipeteo inverso.
3. Siempre que se usen las perlas de recuento hay que asegurarse que los lotes de tubos TRUCOUNT se introduzcan los valores en el software o cuando se realice el calculo manual para la cuenta absoluta. El recuento correcto de microesferas es crítico para determinar el recuento celular. No mezclar tubos de lotes diferentes en un mismo ensayo.
4. Aunque el reactivo de anticuerpo contiene azida de sodio como agente conservante, se debe manejar con cuidado para evitar la contaminación bacteriana que podría causar resultados erróneos.
5. **ADVERTENCIA:** Todas las muestras biológicas y los materiales con que se estén en contacto se deben considerar riesgos biológicos, manipularse como si fueren capaces de transmitir infecciones y desecharse con todas las precauciones adecuadas de acuerdo con los reglamentos federales, estatales y locales. Nunca se debe pipetear con la boca. Se debe usar ropa u guantes protectores adecuados. Se ha informado que la fijación inactiva el VIH.

6. La solución requerida es la solución lisante FACS, esta contiene dietilen glicol y formaldehído.
7. Las perlas de control TRUCOUNT son asignadas para uso con el procedimiento específico de lisado/no lavado. No intentar rebasar el umbral de forward scatter (FCS) para la colección de los datos.
8. Las perlas control La solución requerida es la solución lisante FACS, esta contiene dietilen glicol y formaldehído.
9. Las perlas de control TRUCOUNT son sensibles a la compensación, específicamente en FL2-%F11. Si no se emplea el procedimiento de lisado/no lavado, se debe cuidar que la medición tomada de FL2 sea la adecuada. Almacenar de 2° a 8° C No se debe usar después de la fecha de caducidad que está en el vial.

Instrumento.

Las aplicaciones de TRUCOUNT están diseñadas para citómetros de flujo equipados con apropiados sistemas de computación de hardware y software. El citómetro de flujo deberá estar equipado para detectar tres colores de fluorescencia, la dispersión frontal de la luz (FCS) y la dispersión lateral (SSC). BDIS recomienda usar los citómetros FACSCalibur o el FACSort.

PROCEDIMIENTO

Recolección y preparación de la muestra.

La obtención de la sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa en un tubo de recolección de sangre VACUTAINER K3 EDTA (tapón lila), El reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45, y los tubos TruCOUNT han sido validados con las fórmulas líquida y sólida de K3 EDTA. Para este procedimiento se requiere un mínimo de 100 µl de sangre entera. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante del tubo sobre el volumen mínimo de sangre que se debe obtener para asegurar un uso adecuado.

Se debe obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) y un recuento diferencial de la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para estar seguros de que el recuento de WBC está dentro del rango lineal.

La sangre anticoagulada y almacenada a temperatura ambiente (20° a 25° C) se debe de teñir dentro de las 48 horas de obtenida la muestra y luego se debe de analizar dentro de las 6 horas de haber sido teñida. Si las muestras se tiñen dentro de las 24 horas de obtenidas, se pueden analizar dentro de las 24 horas de la tinción.

Reactivo suministrado

Las microesferas control TRUCOUNT (Becton Dickinson Catálogo No. 34335) Se proporcionan tres viales con concentraciones de perlas fluorescente diferente, bajo, medio y alto.

Reactivos y materiales necesarios que no se suministran

- 1.- Tubos TRUCOUNT (Becton Dickinson No. 340335).
- 2.- Solución lisante FACS (10X), 100 ml Becton Dickinson, No. de catálogo 349202). Las instrucciones para diluir y las advertencias están en el folleto de instrucciones de la solución lisante FACS.
- 3.- Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
- 4.- Tubos VACUTAINER K3 EDTA para recolección de sangre (Becton Dickinson, No. de catálogo 6457) o equivalente.
- 5.- Perlas CaliBRITE.
- 6.- Agitador Vortex.
- 7.- Micropipeta con puntas (Pipeta electrónica BD, Becton Dickinson No. de catálogo 34013290; pipetman Rainin Instrument Co., Inc. o equivalente).
- 8.- Dispensador o pipeta de 450 μ l para dispensar la solución lisante FACS.
- 9.- Líquido de revestimiento (FACSFlow Becton Dickinson, No. de Catálogo 340398 (E.E. Y Latinoamerica) o 342003), o equivalente.

Preparación de los controles.

Después de la tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (20° a 25° C).

Pipeteo inverso

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD o una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos toques de la pipeta.

- Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se aspira al soltar el botón y se expelle al volver a presionar hasta el primer tope.
- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expelle un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer tope, dejando el exceso de muestra en la punta.

Tinción.

Se debe basar en la preparación en cada uno de los insertos de los reactivos para la preparación de la muestra.

1. Extraer del empaque de los tubos TRUCOUNT tres, los cuales se marcan con la leyenda de nivel bajo, medio y alto.

NOTA: Antes de usarlo, verifique que el sedimento de microesferas del TruCOUNT esté intacto y dentro del retenedor de metal al fondo del tubo. Si no es así, deseche el tubo TruCOUNT y réplacelo con otro.

2. Pipetear 20 μ l del reactivo TRiTEST al fondo del tubo.
Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.

3. Pipetar 50 μ l de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo el tubo.
 NOTA : Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo.
 Si se usa un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor.
4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25° C).
5. Anadir 450 μ l de solución lisante FACS 1X al tubo.
6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle, Incubar 15 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está ahora lista para ser analizada en el citómetro de flujo.
7. Mezclar con cuidado cada uno de los viales de los controles por 30 segundos y adicionar 50 μ l de cada uno de los controles (bajo, medio y alto) cada uno de los tubos marcados.

La muestra así prepara esta lista para ser leída en el citómetro.

Citometría de flujo.

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la obscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°).

Agitar las células suavemente en el Vortex (a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo.

BDIS recomienda usar las perlas de caliBRITE y el software tales como FACSCComp, versión 2.0, o posteriores, para ajustar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), la compensación de la fluorescencia y checar la sensibilidad del instrumento previo a su uso. Antes de la adquisición de muestras, se debe ajustar el umbral para reducir al mínimo los restos celulares y asegurarse de que estén incluidas las poblaciones que interesan. Se adquieren los datos usando el software apropiado. Si no se usa un software recomendado por BDIS para calcular las cuentas automáticamente se puede realizar el calculo del recuento en forma manual de los controles bajo, medio y alto.

La etiqueta de la caja de las microesferas de control indica los rangos que se espera obtener con los recuentos de microesferas para las concentraciones alta, media y baja. Los rangos varían de un lote a otro. Si los valores que obtienen están por fuera del rango esperado, se debe sospechar que el pipeteo es impreciso o que hay otros errores en el proceso.

**REPORTE DE LABORATORIO EXPLICITO PROPORCIONADO POR EL
SERVICIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE

Multiset™ Lab Report

Director: Q.F.B. LOURDES DIAZ CONTRERAS
Operator: ILDEFONSO LOZADA MEDINA

Software: Multiset V1.1.1
Cytometer: FACSCalibur (#E1621)

255

Sample Name: GORETI MIRANDA AYALA
Sample ID: 03
Case Number: VALORES DE REFERENCIA
Panel Name: CD4/CD8/CD45 + TRUC

Date Acquired: Thu, Nov 11, 1999 2:22 PM
Date Analyzed: Thu, Nov 11, 1999
Ref. Range Type: BD

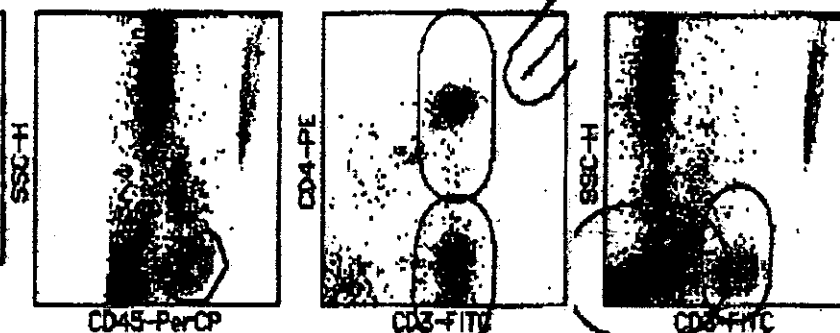
CD3/CD4/CD45 TruC

Data Set [1] Data File: GORETI MIRANDA AYALA03.01

Reagent Lot ID: 00000 Events Acquired: 15000
Beads Per Pellet: 50000

Abs Cnt Bd Lot ID: 00000 Attr Def File: 3/4/45 TruTruC v2.0

Lymph Events	3884
Bead Events	2039
CD3+ %Lymph	71
CD3+ Abs Cnt	1340
CD3+CD4+ %Lymph	38
CD3+CD4+ Abs Cnt	680
CD45+ Abs Cnt	1885



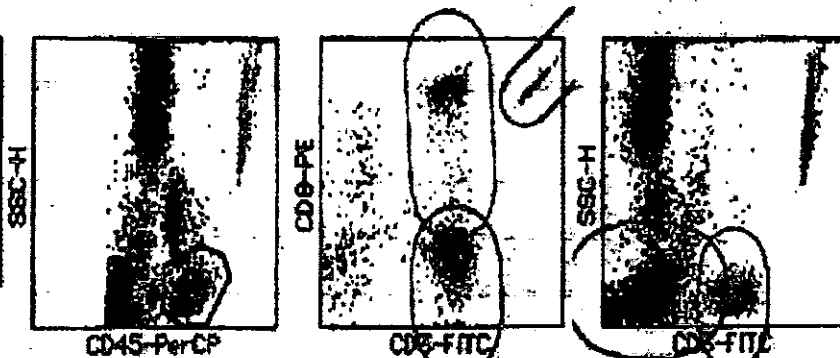
CD3/CD8/CD45 TruC

Data Set [1] Data File: GORETI MIRANDA AYALA03.02

Reagent Lot ID: 00000 Events Acquired: 11880
Beads Per Pellet: 50000

Abs Cnt Bd Lot ID: 00000 Attr Def File: 3/8/45 TruTruC v2.0

Lymph Events	3197
Bead Events	1729
CD3+ %Lymph	70
CD3+ Abs Cnt	1296
CD3+CD8+ %Lymph	32
CD3+CD8+ Abs Cnt	587
CD45+ Abs Cnt	1849



Multi-tube QC

CD3 % Lymph Difference: 1
CD3 Abs Cnt Range: 1296 - 1340
T Helper/Suppressor Ratio: 1.13

REPORTE DE LABORATORIO CONDENSADO PROPORCIONADO POR EL SERVICIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD

C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE

Multiset™ Physician Report

Director: Q.F.B. LOURDES DIAZ CONTRERAS

Operator: ILDEFONSO LOZADA MEDINA

Software: Multiset V1.1.1

Cytometer: FACSCalibur (#E1621)

Sample Name: GORETI MIRANDA AYALA

Sample ID: 03

Case Number: VALORES DE REFERENCIA

Panel Name: CD4/CD8/CD45 + TRUC

Date Acquired: Thu, Nov 11, 1998 2:22 PM

Date Analyzed: Thu, Nov 11, 1999

Reference Range Type: BD

Result Name	%/Ratio	Abs Cnt (cells/ μ L)	Reference Range
T Lymphs % of Lymphs (CD3+/CD45+)	70		55% 84%
T Lymphs (CD3+) Abs Cnt		1318	690 2540
T Helper % of Lymphs (CD3+CD4+/CD45+)	36		31% 80%
CD4 Helper Lymphs (CD3+CD4+) Abs Cnt		680	410 1590
Lymphocyte (CD45+) Abs Cnt*		1872	
T Suppressor % of Lymphs (CD3+CD8+/CD45+)	32		13% 41%
T Suppressor Lymphs (CD3+CD8+) Abs Cnt		587	190 1140

*For quality control purposes only

Multi-tube QC

CD3 % Lymph Difference: 1

CD3 Abs Cnt Range: 1296 - 1340

T Helper/Suppressor Ratio: 1.13

Comments:

 Verbal Order

Laboratory Director:

REPORTE DE CALIBRACIÓN DE TRES COLORES EN EL CITÓMETRO FACSCalibur

3-Color Lyse/No Wash FACSComp Report

Institution: CMN 20 DE NOV

Date: Tue, Oct 12, 1999 1:56 PM

Director: QFB M DE LOURDES DIAZ CONTRERAS

Software: FACSComp v 4.0

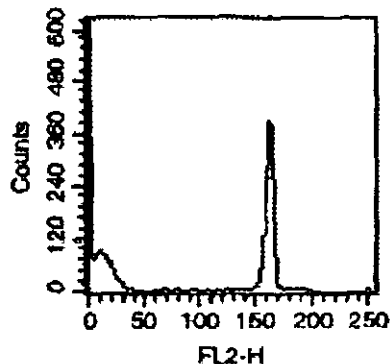
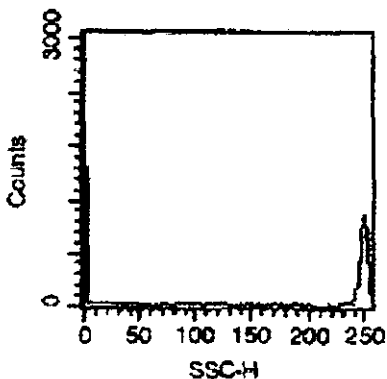
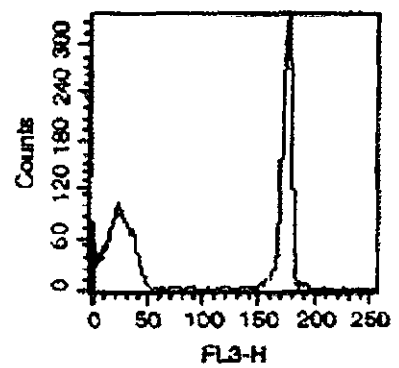
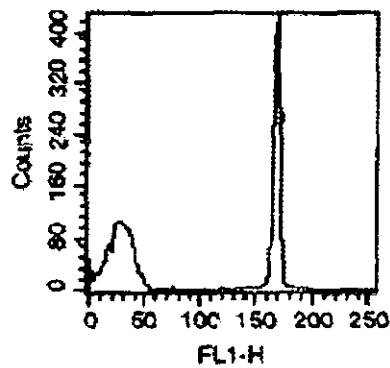
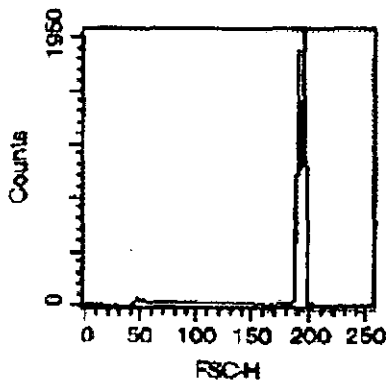
Operator: ILDEFONSO LOZADA MEDINA

Cytometer: FACSCalibur E1621

Parameter	High	Low	Separation	Minimum	Result	Lot ID
FSC	188	46	143	100	Pass	11921I
SSC	241	0	241	210	Pass	11921I
FL1	165	27	138	123	Pass	11922K
FL2	158	9	149	135	Pass	12012H
FL3	170	23	147	135	Pass	11797L

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold	Blue Laser Current 5.56 Amps
FSC	E00	2.00		Blue Laser Power 15.00 mWatts
SSC	407	1.00		
FL1	637	Log		
FL2	487	Log		
FL3	568	Log	300	

Compensation	FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2
	1.0	14.6	0.0	12.0



**REPORTE DE CONTROL DE CALIDAD PARA CÉLULAS CD45+/CD4+/CD3+
CON CONTROLES TruCOUNT NIVEL BAJO, MEDIO Y ALTO.**

CMN ISSSTE 20 DE NOVIEMBRE

Multiset™ Lab Report

Operator: Q. JOAQUIN MENDEZ MEDINA
 Analyst: ILDEFONSO LOZADA MEDINA

Software: Multiset V1.1.1
 Cytometer: FACSCalibur (#E1621)

Sample Name: CONTROL 3
 Sample ID: 22*05*01
 Sample Number: HISTOCOMPATIBILIDAD
 Control Name: 3/4/45 Control

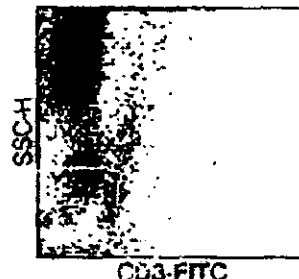
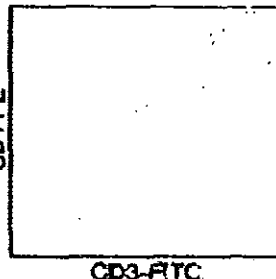
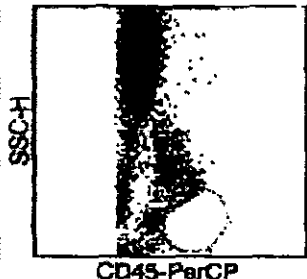
Date Acquired: Tue, May 22, 2001 2:10 PM
 Date Analyzed: Tue, May 22, 2001
 Ref. Range Type: BD

3/CD4/CD45 TruC Ctrl L

Data Set [1] Data File: 22*05*0104.01

Sample Lot ID: 13198 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 10358 Attr Def File: 3/4/45 Tr/TruC v2.0
 Beads Per Pellet: 45050 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 49 Std Dev: 7.90

gated Events	2348
total Events	2248
total Bead Events	110
%Lymph	68.07
Abs Cnt	621 Lo
CD4+ %Lymph	41.86
CD4+ Abs Cnt	394 Lo
3+ Abs Cnt	940
total Bead Abs Cnt	44



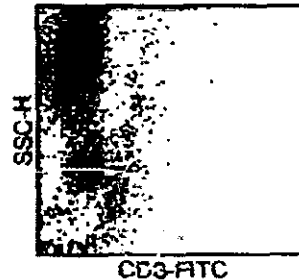
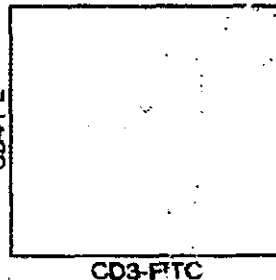
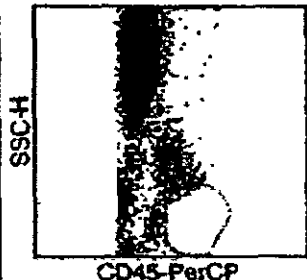
Messages:
 4: The CD3+ Abs Cnt value lies outside the normal reference range.
 4: The CD3+CD4+ Abs Cnt value lies outside the normal reference range.

3/CD4/CD45 TruC Ctrl M

Data Set [1] Data File: 22*06*0104.02

Sample Lot ID: 13198 Events Acquired: 16500 Abs Cnt Bd Lot ID: 10358 Attr Def File: 3/4/45 Tr/TruC v2.0
 Beads Per Pellet: 45050 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 251 Std Dev: 21.80

gated Events	2589
total Events	2308
total Bead Events	608
%Lymph	61.03
Abs Cnt	617 Lo
CD4+ %Lymph	37.93
CD4+ Abs Cnt	383 Lo
3+ Abs Cnt	1011
total Bead Abs Cnt	237



Messages:
 4: The CD3+ Abs Cnt value lies outside the normal reference range.
 4: The CD3+CD4+ Abs Cnt value lies outside the normal reference range.

Sample ID: CONTROL 3
 Case Number: 22*05*01
 Panel Name: HISTOCOMPATIBILIDAD

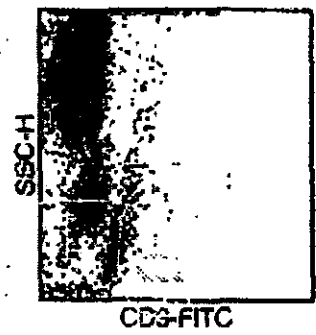
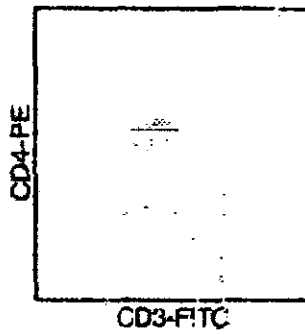
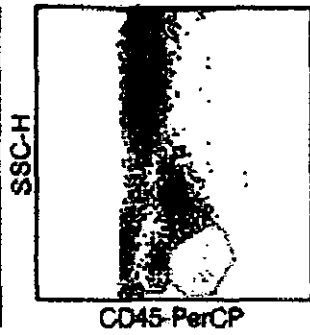
CD4/CD45 TruC Ctrl H

Data Set [1] Data File: 22*05*0104.03

Port Lot ID: 13198 Events Acquired: 16600
 Beads Per Pollat: 46060

Abs Cnt Bd Lot ID: 10358 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC.C v2.0
 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 1009 Std Dev: 65.60

n Events	2375
Events	1976
of Bead Events	2223
%Lymph	64.46
Abs Cnt	698
CD4+ %Lymph	40.51
CD4+ Abs Cnt	439
+ Abs Cnt	1083
of Bead Abs Cnt	1014



-tube QC

% Lymph Difference: 5
 Abs Cnt Range: 617 - 698
 Helper/Suppressor Ratio: 0.00

**REPORTE DE CONTROL DE CALIDAD PARA CÉLULAS CD45+/CD4+/CD3+
CON CONTROLES TruCOUNT NIVEL BAJO, MEDIO Y ALTO.**

CMN ISSSTE 20 DE NOVIEMBRE

Multiset™ Lab Report

Director: Q. JOAQUIN MENDEZ MEDINA
 Operator: ILDEFONSO LOZADA MEDINA
 Sample Name: CONTROL 4
 Sample ID: 22*0501
 Case Number: HISTCOMPATIBILIDAD
 Panel Name: 4/8/3 Control

Software: MultiSET V1.1.1
 Cytometer: FACSCalibur (#E1621)

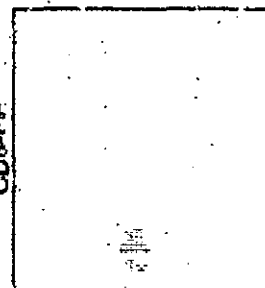
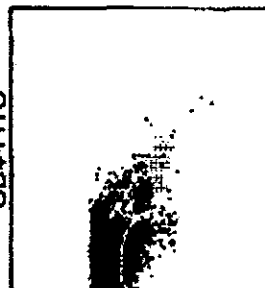
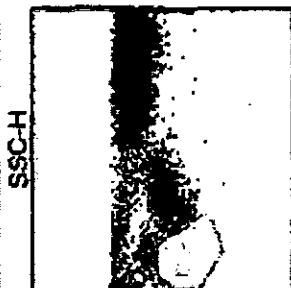
Date Acquired: Tue, May 22, 2001 2:13 PM
 Date Analyzed: Tue, May 22, 2001
 Ref. Range Type: BD

CD4/CD8/CD3 TruC Ctrl L

Data Set [1] Data File: 22*050105.01

Reagent Lot ID: 00000 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 10358 Attr Def File: 4/8/3 Tru/TruC C v2.0
 Beads Per Pallet: 45050 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 49 Std Dev: 7.90

Lymph Events	2533
Control Bead Events	2238
CD3+ Abs Cnt	1020
CD3+CD4+ %T Lymph	64.27
CD3+CD4+ Abs Cnt	655
CD3+CD8+ %T Lymph	24.00
CD3+CD8+ Abs Cnt	245
CD3+CD4+CD8+ %T Lymph	21.20
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	216
H/S Ratio	2.88
Control Bead Abs Cnt	50

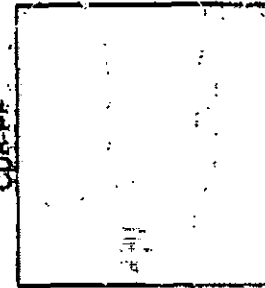
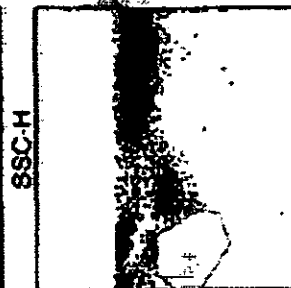


CD4/CD8/CD3 TruC Ctrl M

Data Set [1] Data File: 22*050105.02

Reagent Lot ID: 00000 Events Acquired: 12540 Abs Cnt Bd Lot ID: 10358 Attr Def File: 4/8/3 Tru/TruC C v2.0
 Beads Per Pallet: 45050 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 251 Std Dev: 21.90

Lymph Events	2023
Control Bead Events	1747
CD3+ Abs Cnt	1043
CD3+CD4+ %T Lymph	60.45
CD3+CD4+ Abs Cnt	631
CD3+CD8+ %T Lymph	23.23
CD3+CD8+ Abs Cnt	242
CD3+CD4+CD8+ %T Lymph	19.97
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	208
H/S Ratio	2.60
Control Bead Abs Cnt	242



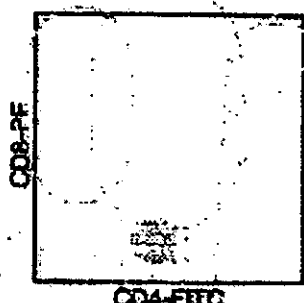
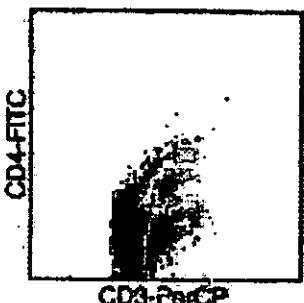
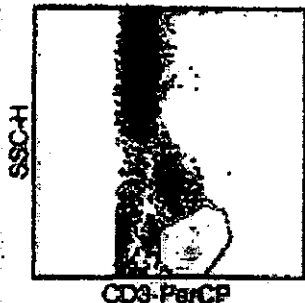
Sample ID: CONTROL 4
 Assay Number: 22*0501
 Panel Name: HISTOCOMPATIBILIDAD

CD8/CD3 TruC Ctrl H

Data Set | 1 | Data File: 22*050105.09

Lot ID: 00000 Events Acquired: 12540 Abs Cnt Bcl Lot ID: 10368 Attr Def File: 4/8/3 Tru/Tru C v2.0
 Beads Per Pellet: 45050 Ctrl Bead Lot ID: 16052 Mean Count: 1009 Std Dev: 65.60

h Events	1843
vents	1676
Bead Events	1818
sa Cnt	991
04+ %T Lymph	63.81
04+ Abs Cnt	632
08+ %T Lymph	25.77
08+ Abs Cnt	265
04+CD8+ %T Lymph	22.03
04+CD8+ Abs Cnt	218
ratio	2.48
Bead Abs Cnt	977



Tube QC

as Cnt Range: 991 - 1043
 er/Suppressor Ratio: 2.58

BIBLIOGRAFIA

- 1.- García Moreno J., García del Moral R. Laboratorio y atlas de citología. España: Editorial Interamericana- Mac Graw Hill, 1995; 234-252.
- 2.- Marieke Comans J., Bitter and Col. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J. Pediatrics*, 1996; 130: 3, 388-393.
- 3.- Carleton C.; Cell Preparation for the Identification of Leukocytes. *Methods in Cell.*, 1975; 41:39-60.
- 4.- Salman G., Crowell J., Martin J.C., Mullaney P.F.; Cell Classification by Laser Light Scattering: Identification and Separation of Unstained Leukocytes. *Acta Cytol.* 1997; 19: 4, 374-377.
- 5.- Fleisher T., Russell H.; Introduction to Diagnostic Laboratory Immunology. *JAMA*, 1997; 278:22, 1823-1834.
- 6.- Fleisher T., Russell H.; Use and Interpretation of Diagnostic Immunologic Laboratory Test. *JAMA*, 1992; 268:20, 2970-2990.
- 7.- Simson E., Groner W.; Variability in Absolute Lymphocyte Counts Obtained by Automated Cell Counters. *Cytometry*, 1995; 22:26-34.
- 8.- Soto C., Alvarado F., Manual de Fenotipificación Inmunologica por citometría de flujo de Rayo Laser de los linfocitos CD4/CD8 (1ª parte). *Boletín Mensual SIDA/ETS*, 1994; 8:2, 2608-2613.
- 9.- Soto C., Alvarado F., Manual de Fenotipificación Inmunologica por citometría de flujo de Rayo Laser de los linfocitos CD4/CD8 (2ª parte). *Boletín Mensual SIDA/ETS*, 1994; 8:2, 2628-2652, 1994.
- 10.- Soto C., Alvarado F., Manual de Fenotipificación Inmunologica por citometría de flujo de Rayo Laser de los linfocitos CD4/CD8 (3ª parte). *Boletín Mensual SIDA/ETS*, 1994; 8:2, 2648-2653.
- 11.- Rocío Ortiz, Leticia Cortes, Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos, estudio por citometría de flujo. *Bioquímica*, 1999; 24:1, 18-22.
- 12.- Francisco A. Bonilla, Hans C., Normal ranges for lymphocyte subsets in children. *J. Pediatr.*, 1997; 130:3, 347-349.
- 13.- P. de Paoli, S. Battistin. Age Related in Human Lymphocyte Subsets: progressive Reduction of de CD4 CD45R. *Clin. Immunol. Immunopathol*, 1988; 48; 290-296.
- 14.- Irene Hannet, et al. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunology Today*, 1992; 13:6, 215-218.
- 15.- Platt William. Atlas de Hematología en color. España: Editorial JIMS, 1982; 23-27.
- 16.- Abbas Abul K, Lichtman A. Inmunología celular y molecular. 2ª ed. México: Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1996.
- 17.- Vengelen-Tyler V. Manual técnico AABB. 12ª ed. Argentina: Ed. Hernán Cardinale/Edigraf S.A., 1997: 185-209.
- 18.- Woessner S. Técnicas en citología hematológica. España: Editorial MEDICI, 1990: 110-121.
- 19.- Neil Barclay A., D. Beyers A. The leucocyte antigen, Facts book. 2ª ed. Gran Bretaña: Editorial Academic Press, 1994: 21-35, 89, 91-120, 203-205.
- 20.- Haynes J., Principles of flow cytometry. *Cytometry*, 3:7-17, 1988.
- 21.- Goetzman E. Flow cytometry: Basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. *Clin. Immunol. Science*, 1993; 6:3, 177-182.
- 22.- Razo Morales D., García Navarro J. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. *Rev. Mex. Patol. Clin.*, 1996; 43:1, 21-26.

- 23.-Hulstaert F.,Hannet I.,Deneys V. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994; 70:2, 152-157.
- 24.-Reichert T.,DeBruyere M., Deneys V. Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasian. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1991; 60: 190-208.
- 25.- Kreuzfelder E., Shen G., Rodeck U. et al. Relative and absolute number of human lymphocyte subpopulation. *J. Immunol. Methods.*,1987; 97:251-258.
- 26.- Shahabuddin S., Quantitative differences in CD8+ lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cell, and HLA-DR+-activated T cell or racial different male populations. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1995; 75:2,168-170.
- 27.- Jane Hicks M. Age-related changes in T- and B-lymphocyte subpopulations in the peripheral blood. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1983; 107: 518-523.
- 28.- Bradley L., Bradley J., Ching D. Predominance of cell that express CD45R in the CD4+ helper/inducer lymphocyte subset of neonates. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1989; 51: 426-435.
- 29.-Karbowski I., Appel S. Determination of lymphocyte subpopulations by enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods.*,1988; 112: 31-35.
- 30.- Gerli R., Bertotto A., Spinozzi F. Phenotypic dissection of cord blood immunorelatory T-cell subsets by using a two-color immunofluorescence study. *Clin. Immunol. Immunopathol.*,1986; 40:429-435.
- 31.- Erkeller-Yuksel F., Deneys V., Yuksel B. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J. Pediatric.*,1992; 120:2, 216-22.
- 32.- Landay A., Auer R. Proposed guideline, clinical applications of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes.NCCLS, 1989; 9:13, 760-849.
- 33.- Schmid I.,Kunkl A., Nicholson J. Biosafety consideration for flow cytometric analysis of human immunodeficiency virus-infected samples. *Cytometry*, 1999;38:195-200.