

Comparación de rendimiento de 3 metodologías para obtención de células T a partir de muestras de piel para estudio por citometría de flujo

Cristopher Palma-Espinoza¹, Luis Viveros-Bello², Ariadna Rocha-Vásquez¹, Mauricio Chandía-Cabas³

1. Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Regional de Concepción, 2. Facultad de medicina, Universidad de Concepción, 3. Facultad de medicina, Universidad de Concepción; Servicio de Hematología y Unidad de Anatomía patológica Hospital Regional de Concepción.

INTRODUCCIÓN:

La piel alberga poblaciones linfocitos T (LT) residentes cuya caracterización fenotípica es muy importante en el diagnóstico de linfomas cutáneos, la mayoría de los cuales son de estirpe T. La técnica más utilizada es la inmunohistoquímica en biopsias de piel, la cual sólo evalúa fenotipo sin demostrar clonalidad. El aislamiento de las células por citometría de flujo (CMF) es una técnica potencialmente útil en este escenario clínico, permitiendo la caracterización inmunofenotípica a la vez que estudia la clonalidad de los LT. Sin embargo, la presencia de una densa matriz extracelular representa un desafío técnico que dificulta la extracción de una cantidad suficiente de los LT para el análisis.

OBJETIVO:

Evaluar el rendimiento de 3 protocolos de laboratorio para la obtención de linfocitos T para estudio por citometría de flujo a partir de muestras de tejido cutáneo.

MÉTODOS:

Se obtuvo muestras de piel a partir de piezas de extremidades amputadas por razones médicas y enviadas a anatomía patológica. Los protocolos se clasificaron en tres grupos para su análisis: Uno basado en disgragación enzimática (DE), y 2 basados en disgragación mecánica (disgregación mecánica con mortero (DM) y disgragación mecánica con pathocutter (DP)). Para cada muestra, se registraron sistemáticamente las dimensiones del trozo de tejido (largo, ancho y alto) con el fin de calcular el rendimiento de LT CD3+ por superficie de tejido ($CD3/cm^3$). Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP Y CD4-APC y fueron adquiridas en citómetro FACSCanto 2. El análisis de los datos de citometría se realizó con software Infinicyt®. Para el análisis estadístico se utilizó el lenguaje python en conjunto con las librerías scipy.stats (prueba Kruskal-Wallis) y para evaluar si existían diferencias en el rendimiento se utilizaron scikit_posthocs (prueba post-hoc de Dunn con ajuste de Bonferroni).

RESULTADOS:

Se obtuvieron un total de 10 especímenes, en los cuales se realizaron 20 comparativas, de las cuales un 38% se procesaron con DM, 43% con DE y 19% con DP. En promedio, la recuperación de linfocitos T totales CD3+ fue de 570 células para DM, 166 para DE y 85 para DP, lo que no fue estadísticamente significativo ($p = 0.6147$). El rendimiento de los métodos (cantidad de linfocitos T CD3+/cm³) demostró que existían diferencias significativas entre los tres métodos de disgragación ($p = 0.029$), siendo la DE el método con mayor número de células por unidad de volumen (446 céls/cm³) en relación a la DM (94 céls/cm³) y la DP (789 céls/cm³) ($p = 0.039$).

CONCLUSIÓN:

El método de disgragación utilizado afecta significativamente el rendimiento en la obtención de un número adecuado de linfocitos T por volumen de tejido para su estudio por CMF, siendo la DE el método más eficiente en relación con los métodos de disgragación mecánica (DM + DP).