

Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica

Pérez-Lara Jocelyn Carolina^{1,2}

Santiago-Cruz Wendolaine^{1,2}

Romero-Ramírez Héctor³

Rodríguez-Alba, Juan Carlos^{1,2,4}

Introducción

Anton Van Leeuwenhoek fue la primera persona en observar y describir una célula viva a través de microscopios que constaban de un lente ocular con capacidad de realizar hasta 250 aumentos (Backer & Robertson, 2016). Gracias a la genialidad de Leeuwenhoek, hoy sabemos que los seres vivos somos organismos constituidos por diferentes tipos celulares con funciones específicas que trabajan en conjunto para mantener una homeostasis. Sin embargo, ello no podría conocerse sin las herramientas que nos permitan observar, reconocer y clasificar el comportamiento de cada una de las células. Los microscopios nos permiten identificar a las células de acuerdo con su morfología; sin embargo, existen células que morfológicamente son idénticas, pero funcionalmente diferentes, como es el caso de los linfocitos. Estos últimos pueden registrarse en el microscopio óptico mediante una simple tinción de Wright; no obstante, sería imposible discernir entre un linfocito T y un linfocito B. Es aquí donde la citometría de flujo toma relevancia y se encarga de resolver este problema.

La citometría de flujo es una técnica de análisis que permite identificar a diferentes poblaciones celulares simultáneamente, así como obtener gran información de ellas dependiendo de las proteínas que se expresen. En la siguiente revisión se mostrará el fundamento de la citometría de flujo y sus aplicaciones.

¹Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

²Unidad de Citometría de Flujo, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

³Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, CDMX, México

⁴Autor de correspondencia: carlorodriguez@uv.mx jcra19@yahoo.com

Recibido: 30/11/2018

Aceptado: 8/12/2018

Definición

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (Marti, Stetler-Stevenson, Bleesing, & Fleisher, 2001).

¿Cómo funciona el citómetro de flujo?

Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas, el de fluidos, el óptico, y el electrónico (Figura 1) (Shapiro, 2003). En este apartado se abordará con detalle en qué consiste cada uno de ellos.

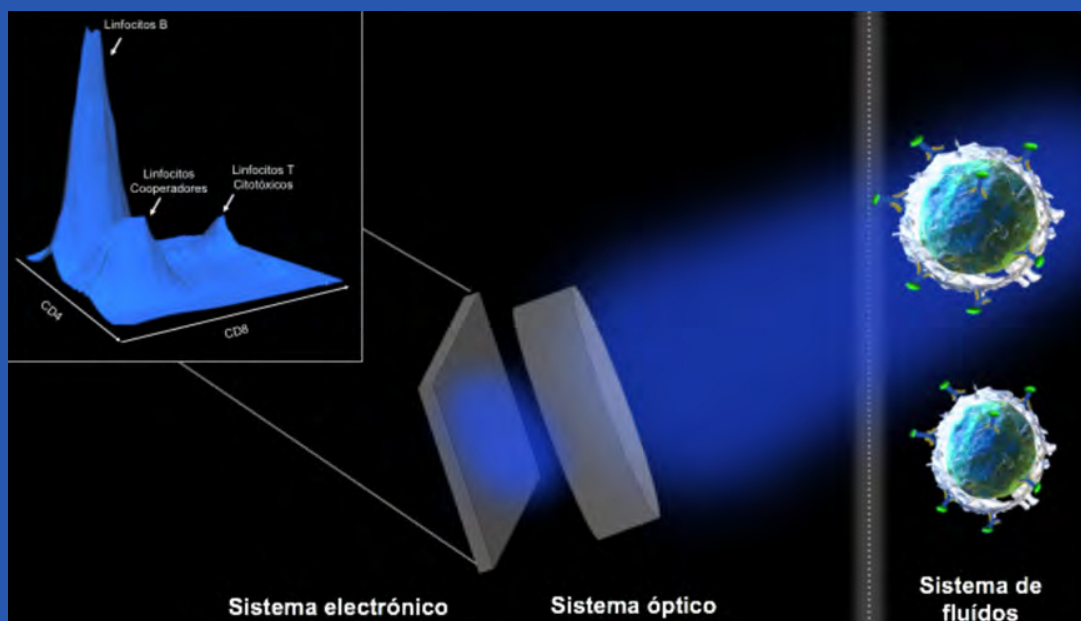


Figura 1. Componentes de un citómetro de flujo. Éste se integra por tres sistemas: el sistema de fluidos, que se encarga de transportar las células hacia el haz de luz; el sistema óptico, compuesto por láseres y detectores que registran la luz emitida por la célula, y un sistema electrónico que recibe las señales luminosas y las codifica en gráficos.

Sistema de fluidos

Su principal función es alinear y transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz; por tanto, es necesario que la muestra se encuentre suspendida en un fluido (Hoffman, 2008). Para lograrlo, se aplica una propiedad hidrodinámica, que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente, el cual puede ser agua o un buffer de fosfatos. Lo anterior se logra porque la presión de la muestra es mayor que la presión del líquido envolvente. Gracias a este sistema, las células pueden ser alineadas en “fila india”, y de esta manera se asegura que el haz de luz incida sobre una célula a la vez (Hoffman, 2008).

Sistema óptico

El sistema óptico está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Las células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad. En caso de que la luz se disperse frontalmente, se obtendrá un parámetro denominado FSC (forward scatter), que indica el tamaño de la célula (Figura 2) (Hawley & Hawley, 2004; Shapiro, 2003). Por tal motivo, aquellas células marcadas con fluorocromos serán excitadas por el láser y la luz será dirigida hacia un detector, el cual recibirá la longitud de onda emitida por la excitación del fluorocromo.

Gracias a este sistema, se puede conocer el tamaño y la granularidad de la célula, así como las proteínas que se expresan (marcadores), permitiendo así la identificación de diferentes tipos celulares. A medida que el citómetro posea más detectores, mayor será su capacidad para identificar poblaciones celulares (Hoffman, 2008).

Sistema electrónico

Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, ésta debe traducirse en señales electrónicas. El sistema electrónico consta de sensores luminosos como fotodiodos y fotomultiplicadores, que tienen la finalidad de convertir los fotones en electrones y éstos, a su vez, en corriente eléctrica. De este modo, la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas (Marti et al., 2001).

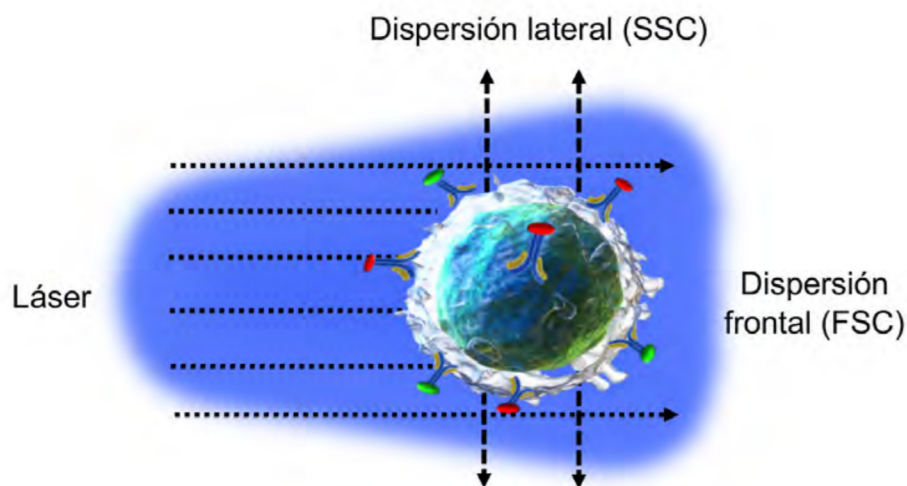


Figura 2. Dispersión de luz. La imagen representa la dispersión de la luz emitida una vez que el haz de luz incidió sobre la membrana celular. La desviación frontal de la luz determina el tamaño celular (FSC) mientras que la dispersión lateral determina la complejidad (SSC).

Anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos

Como se mencionó anteriormente, el marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo (Barberena, Ríos, & Muñiz, 2014). Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células. Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser (Mao & Mullins, 2010); de este modo, la célula se “tiñe” y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador.

Gracias al avance de la ciencia, hoy en día se cuenta con una gran cantidad de anticuerpos acoplados a fluorocromos que, cuando son excitados, emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, algunas moléculas emitirán luz verde, naranja, azul, roja o amarilla, dependiendo del fluorocromo seleccionado. Ello permitirá estudiar di-

versas poblaciones celulares a la vez. Es importante mencionar que, dependiendo del modelo de citómetro de flujo que se utilice, será la cantidad de colores que se puedan leer simultáneamente. En la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana, se encuentra un citómetro de flujo capaz de detectar hasta 16 parámetros diferentes, lo que permite obtener suficiente información para analizar y caracterizar diversas poblaciones celulares (Figura 4).

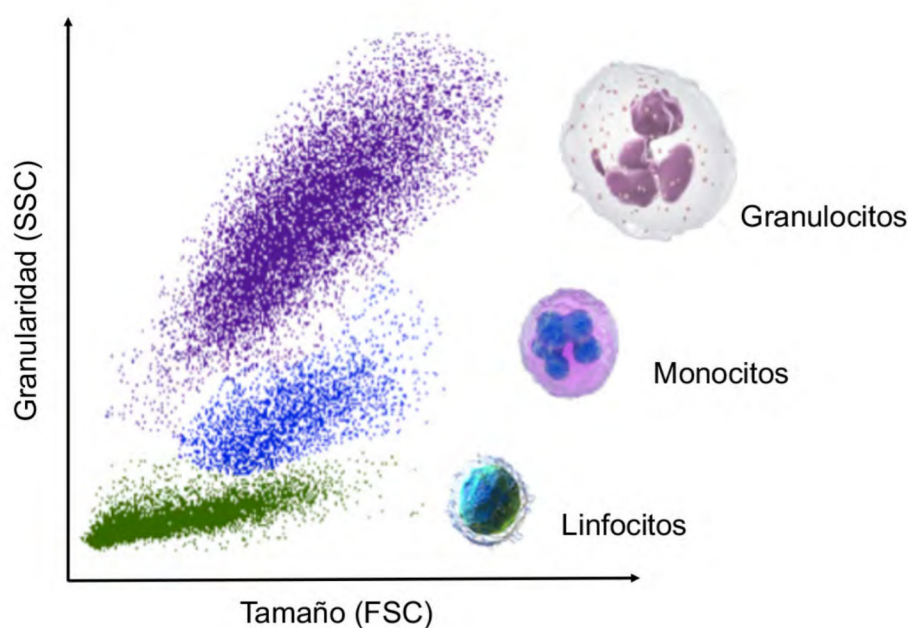


Figura 3. Identificación de leucocitos de sangre periférica de acuerdo con su tamaño y granularidad. Los linfocitos son células pequeñas y poco granulares por lo que se representan cerca del origen; le siguen los monocitos con un tamaño y granularidad mayor y finalmente, los granulocitos, que son las células de mayor tamaño y complejidad.

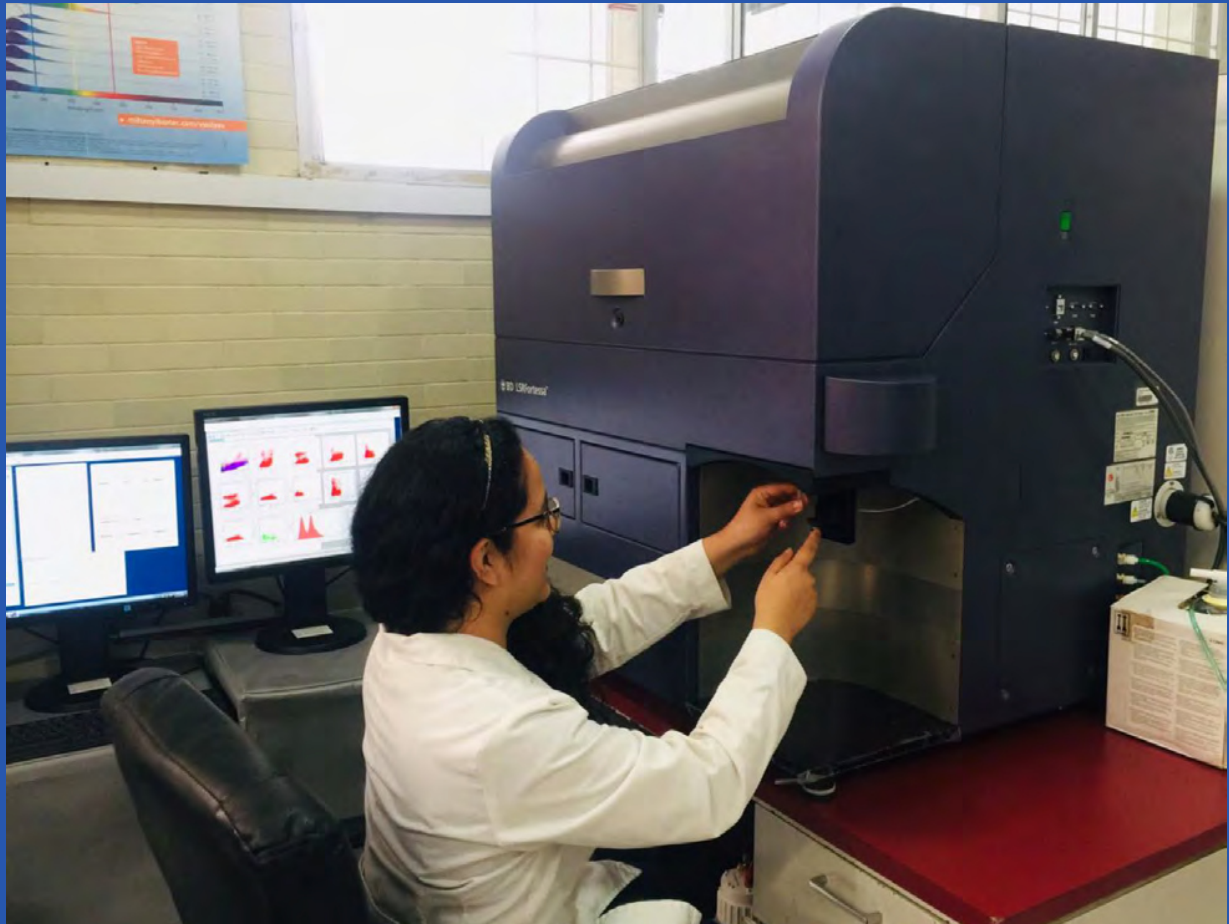


Figura 4. Alumna del Doctorado en Ciencias de la Salud adquiriendo muestras en el Citómetro de flujo BD LSRFortessa.

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos pueden ser representados mediante diferentes estilos, desde una gráfica de puntos hasta una figura tridimensional; la clave se centra en seleccionar los gráficos que reflejen los resultados con precisión y sin generar confusiones. A continuación se describen las representaciones más utilizadas en esta área:

Gráfico de puntos: Este gráfico muestra la relación entre dos marcadores diferentes y muestra a cada punto como un evento (se define como evento a cualquier partícula que haya sido excitada por el láser). Por tal motivo, el desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica la expresión de un marcador X, mientras que el desplazamiento de los puntos hacia arriba, muestra la expresión de un marcador Y (Figura 5).

Gráficos de densidad: Estos gráficos, además de representar a las poblaciones con base en la expresión de dos marcadores, muestran la frecuencia relativa (densidad) de las poblaciones; por ejemplo, las poblaciones con mayor número de eventos se representan mediante tonos de gris más intenso (gráfico de zebra), mediante colores cercanos al naranja (gráfico pseudocolor), o mediante líneas (gráfico de contornos) (Figura 5).

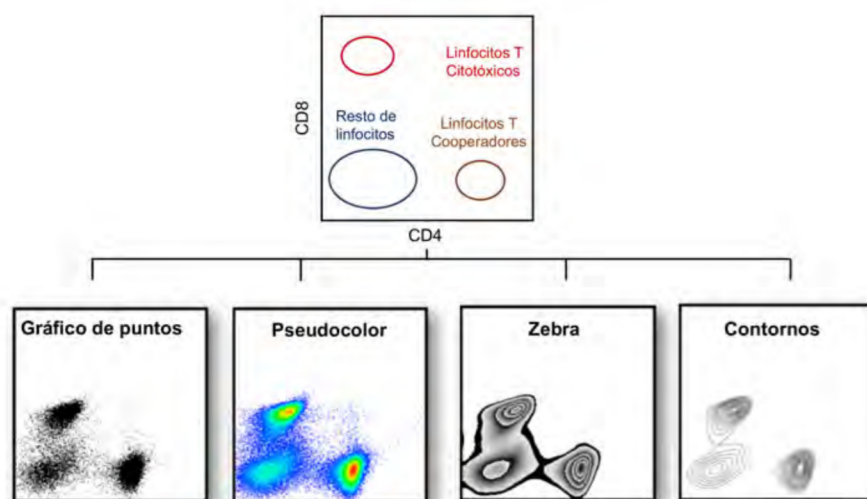


Figura 5. Gráficos de puntos y de densidad. La figura muestra las poblaciones de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos, representadas en gráfico de puntos, pseudocolor, zebra y contornos.

Histogramas: Los histogramas muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas (Figura 6). En este sentido, es importante recalcar que el área bajo la curva contiene a las células que se están analizando.

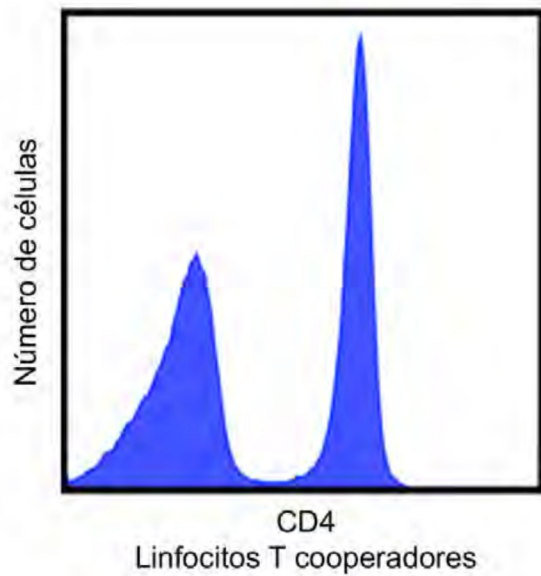


Figura 6. Histogramas. En el histograma se observan dos picos; el pico de la derecha representa a las células positivas para el marcador de linfocitos T cooperadores CD4, mientras que el de la izquierda muestra las células negativas para este marcador. Se observa que el pico de la derecha es más alto que el de la izquierda; por tanto, existe un mayor número de linfocitos que expresan al marcador CD4 (T cooperadores), con respecto a aquellos que no lo expresan

Gráficos 3D: Este tipo de gráficos permite comparar a las poblaciones con respecto a la expresión de tres marcadores diferentes y la frecuencia relativa (Figura 7 B). Los histogramas también pueden ser representados en gráficos de 3D, lo que permite la comparación de la expresión de dos marcadores diferentes versus el número de eventos (Figura 7 A).

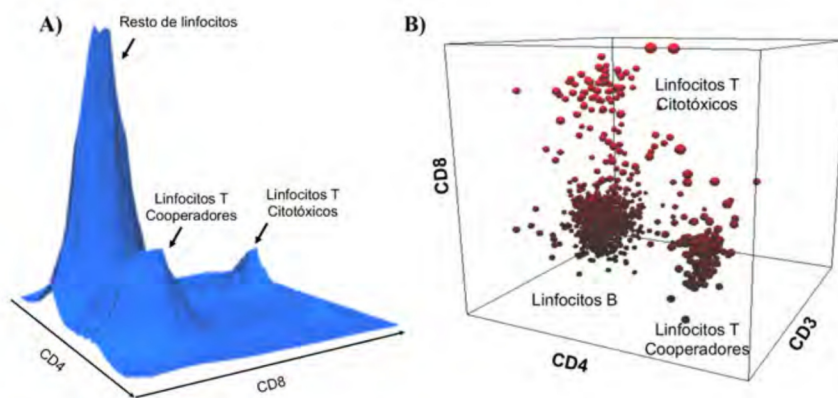


Figura 7. Gráficos tridimensionales. A) Histograma tridimensional que identifica las poblaciones de linfocitos T cooperadores y linfocitos T Citotóxicos, de acuerdo con la expresión de CD4 y CD8; la altura de los picos indica el número de células registradas. B) Dot plot tridimensional que muestra a las poblaciones de linfocitos B (por exclusión), linfocitos T Cooperadores y linfocitos T Citotóxicos, de acuerdo con la expresión de CD3, CD4 y CD8.

Aplicaciones de la citometría de flujo

Por tratarse de una técnica de identificación y cuantificación específica de células, la citometría de flujo facilita el diagnóstico o seguimiento de patologías como leucemias, linfoma, inmunodeficiencia primaria, monitoreo del estado hematológico de pacientes con infección de VIH, así como la detección de células cancerosas o tumorales (Bürgisser et al., 1999; Lacombe et al., 1997) as defined by CD28 and CD38 expression, and plasma viraemia and CD4+ T cells in HIV-1 infection was investigated. In a cross-sectional study of 46 patients with either no or stable anti-retroviral treatment, there was a strong negative correlation between the percentage of CD8+CD28- and the percentage of CD4+ T cells ($r = -0.75$, $P < 0.0001$). Adicionalmente, esta herramienta permite analizar funciones celulares como la proliferación, la fagocitosis y la apoptosis, por mencionar algunas. Lo anterior es posible gracias a que en el mercado existen diversas moléculas fluorescentes que se incorporan cuando las células realizan este tipo de funciones. Por ejemplo, para determinar la proliferación celular, las células pueden ser teñidas por medio de una molécula fluorescente denominada éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE), la cual se incorpora al interior de la célula, y ésta es diluida cuando la célula entra en proliferación, es decir, la reducción en la fluorescencia de la molécula indica mayor proliferación celular (Quah & Parish, 2010).

Por otra parte, la citometría de flujo también permite identificar, caracterizar y separar poblaciones celulares (Mattanovich & Borth, 2006). Los equipos que pueden realizar este trabajo se denominan Cell Sorters. En la clínica, esta técnica tiene una importante función en la purificación de células que posteriormente serán transplantadas a pacientes con ciertas patologías. Tal es el caso de la nueva terapia aprobada por la FDA para tratar linfoma de linfocitos B, la cual consiste en el trasplante de linfocitos T con receptores de antígeno modificados (CAR-T, por sus siglas en inglés) (Androulla & Lefkothea, 2018; Schuster et al., 2017). Este proceso implica purificar los linfocitos T del paciente y modificarlos genéticamente para expresar un receptor de superficie específico para un antígeno de cáncer, que a su vez se encuentra fusionado con un dominio proteico que activa al linfocito T. Posteriormente, los linfocitos CAR-T se expanden y se reinfunden en el paciente como una inmunoterapia para atacar a células cancerosas (Androulla & Lefkothea, 2018).

Es importante señalar que la citometría no se limita al estudio de células, pues por medio de esta técnica también se puede conocer la cantidad de RNA o DNA que posee una célula, lo cual tiene una alta aplicación en el pronóstico de diversos tipos de cáncer (Nunez, 2001).

Actualmente, la citometría de flujo es una poderosa herramienta para el diagnóstico, clasificación y determinación del pronóstico de diversas enfermedades; no obstante, es imprescindible vincular la investigación biomédica con la investigación clínica, y de esta manera, fortalecer la caracterización de nuevas poblaciones celulares que se encuentren implicadas en el desarrollo de estas patologías.



Referencias Bibliográficas:

Androulla, M. N., & Lefkothea, P. C. (2018). CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1), 5–18. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>

Backer, J., & Robertson, L. (Lesley A. (2016). Antoni van Leeuwenhoek : master of the minuscule.

Barberena, E. C., Ríos, E. C., & Muñiz, A. R. O. (2014). Manual de prácticas de laboratorio de Citometría de Flujo. Retrieved from <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/MCF.pdf>

Bürgisser, P., Hammann, C., Kaufmann, D., Battegay, M., Rutschmann, O. T., & STUDY, T. S. H. C. (1999). Expression of CD28 and CD38 by CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. *The Swiss HIV Cohort Study. Clinical and Experimental Immunology*, 115(3), 458–463. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1999.00818.X>

Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (2004). Flow cytometry protocols. Humana Press.

Hoffman, R. A. (2008). Flow Cytometry: Instrumentation, Applications, Future Trends and Limitations. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II* (pp. 307–342). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/4243_2008_037

Lacombe, F., Durrieu, F., Briais, A., Dumain, P., Belloc, F., Bascans, E., ... Bernard, P. (1997). Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* (Vol. 11). Retrieved from <https://www.nature.com/articles/2400847.pdf?origin=ppub>

Mao, S.-Y., & Mullins, J. M. (2010). Conjugation of Fluorochromes to Antibodies. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 588, pp. 43–48). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_6

Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, J. J., & Fleisher, T. A. (2001). Introduction to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2), 93–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309691>

Mattanovich, D., & Borth, N. (2006). Applications of cell sorting in biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 5, 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-12>

Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 67–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488413>

Quah, B. J. C., & Parish, C. R. (2010). The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (44). <https://doi.org/10.3791/2259>

Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, Ö., ... June, C. H. (2017). Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2545–2554. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708566>

Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471722731>