

Citometría de Flujo en el laboratorio clínico

María Inés Goldaracena
Bioquímica - Farmacéutica
Especialista de aplicaciones en Citometría de Flujo
Argentina-Uruguay- Paraguay-Área Andina

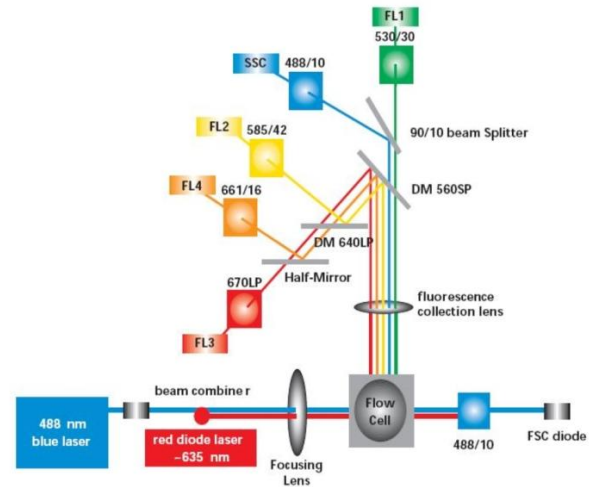
BD Biosciences
mgoldaracena@bd.com
www.bdbiosciences.com

Hace ya unos años, que el uso de la técnica de Citometría de Flujo se ha transformado en una herramienta indispensable en el área clínica, ya que permite realizar el diagnóstico y pronóstico de diferentes patologías, así como el seguimiento terapéutico correspondiente, con un alto grado de confiabilidad, sensibilidad y reproducibilidad.

Esta técnica es un método rápido cualitativo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. Permite medir información precisa de cada célula en particular y luego identificar distintas poblaciones celulares en mezclas complejas, diferenciándolas según: tamaño, complejidad citoplasmática y composición antigénica y bioquímica con un alto grado de especificidad, incluso cuando están escasamente representadas.

El equipo consta de una fuente de excitación láser que evalúa cada célula de la mezcla según sus características físicas y de fluorescencia, ya sea en membrana celular o en el citoplasma. Para el análisis de estos parámetros se necesitan, no sólo anticuerpos monoclonales unidos a distintos colorantes fluorescentes, sino también programas específicos de análisis que permitan descifrar toda la información registrada para extraer la mayor información posible. La marcación de las muestras se realiza mediante incubación con mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con distintos tipos de fluorocromos o compuestos químicos con propiedades fluorescentes. Se utilizan fluorocromos que tienen la propiedad de absorber energía de él o los lasers del citómetro, emitiendo luego fluorescencias de longitudes de onda lo suficientemente diferentes como para ser medidas en forma aislada unas de otras.

FIGURA 1: Estructura óptica básica de un Citómetro de Flujo



Monitoreo de poblaciones linfocitarias en pacientes con VIH

La Citometría de Flujo se introdujo en el laboratorio de análisis clínicos a principios de los años noventa, para el análisis de poblaciones linfocitarias en casos de pacientes infectados por el virus de VIH. Al ir descubriendo los mecanismos de esta patología se determinó que la cuantificación en sangre periférica de los linfocitos T Helper (CD3+CD4+) y los linfocitos T Citotóxicos (CD3+ CD8+), aporta un valor pronóstico y diagnóstico para el paciente. Estas mediciones son muy importantes para el médico, ya que los valores obtenidos influyen directamente en la elección del tratamiento para estos pacientes.

Dado que la técnica de Citometría de Flujo nos permite informar valores porcentuales de células presentes en la muestra, es necesario aportar datos adicionales para realizar la cuantificación de estas poblaciones y remitir un resultado de linfocitos T Helper en número de células por microlitro. Hay principalmente dos técnicas utilizadas para esta cuantificación que se denominan técnicas de simple y doble plataforma.

En el método de simple plataforma el sistema de cuantificación celular se compone de una cantidad conocida de partículas sintéticas homogéneas y fluorescentes que se mezclan con la muestra del paciente y sirven como patrón

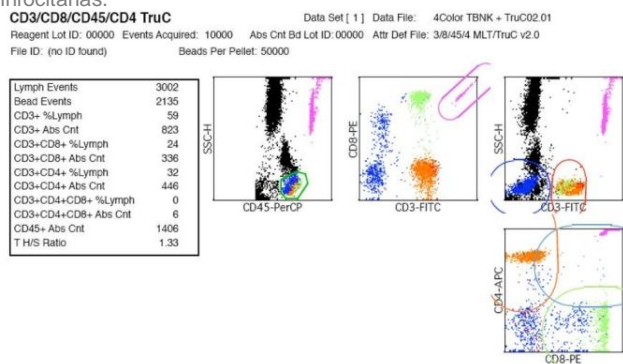


interno. Al analizar la muestra se determina qué proporción del total de la muestra fue tomada por el citómetro y en función de ese dato se determina el número inicial de células en la alícuota de sangre entera utilizada (resultado: células/microlitro). En este caso, tanto la determinación porcentual como el recuento absoluto se realizan en forma simultánea en el mismo tubo. Este es el sistema recomendado en las últimas guías de procedimientos del CDC, publicadas en 2003, y la metodología utilizada actualmente en los laboratorios de Citometría de Flujo del Programa Nacional de Lucha contra Retrovirus Humano, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y Enfermedades de Transmisión Sexual.

Algunos laboratorios realizan una aproximación de la cuantificación celular combinando los datos de Citometría de Flujo con los datos del hemograma del paciente. Esto se denomina doble plataforma ya que el análisis absoluto se obtiene con datos de otro equipamiento realizado con una alícuota de muestra distinta a la utilizada en Citometría. Para esto es indispensable que en cada tubo se realice la marcación del CD45 (marcador leucocitario) ya que esta aproximación se calcula sobre la base de la correlación entre los datos de linfocitos por microlitro que informa el hemograma y la población CD45+ intensa que identifica los linfocitos en la citometría. En ausencia de este marcador se realiza una estimación de las células linfoides solo por su tamaño y complejidad, lo cual puede llevar a una mayor dispersión de los resultados.

Para esta aplicación se han desarrollado programas específicos para la adquisición de datos del Citómetro de Flujo y la realización del análisis automático de las poblaciones celulares de interés. Cada muestra es analizada por selección de la población linfocítica mediante la medición de la granularidad celular versus la fluorescencia del marcador para CD3 o CD45. Se cuantifican las poblaciones mediante el sistema de partículas y se delimita cada subpoblación de linfocitos T CD3, CD4 y CD8, mediante regiones dinámicas que se ajustan automáticamente para cada muestra. La estandarización del proceso de marcación y cuantificación así como el algoritmo de análisis automático, permiten lograr una mayor reproducibilidad y precisión de los resultados.

FIG2: resultados absolutos y porcentuales de poblaciones linfocitarias.



Diagnóstico y seguimiento en patologías Hematológicas

Las leucemias y los linfomas constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una expansión clonal de las células hematopoyéticas en el momento de su maduración normal, afectando cualquiera de los tipos celulares presentes en médula ósea, ganglio o bazo. La identificación del tipo celular involucrado resulta crucial tanto para la patogénesis de estos tumores como para evaluar el pronóstico y decidir el correcto tratamiento de cada uno de ellos. Para realizar el diagnóstico de estas patologías se debe analizar en forma conjunta el estado clínico del paciente, la morfología celular, la expresión de enzimas específicas de linajes y el análisis por Citometría de Flujo de distintos paneles de anticuerpos monoclonales. Estos últimos, no sólo definen los linajes involucrados sino que permite realizar la subclasificación celular según la expresión de antígenos de diferenciación (CDs) presentes en la membrana celular y en el citoplasma.

La utilización de la técnica de Citometría de Flujo colabora, además, en la toma de decisión sobre la terapéutica a seguir y permite realizar el seguimiento posterior del paciente analizando el grado de éxito obtenido con la terapia seleccionada mediante análisis de Enfermedad Mínima Residual. En este caso es fundamental optimizar la sensibilidad de las determinaciones tanto con el control de calidad del equipo como por el uso de programas especiales de análisis como el Paint-A Gate PROTm para evaluación de eventos de baja frecuencia.

Una de las aplicaciones clínicas importantes del análisis por Citometría de Flujo es la evaluación del contenido celular de ADN para determinar ploidía y frecuencia de células en las distintas fases del ciclo celular. Las células que tienen una cantidad anormal de material genético (aumento o disminución) se denominan aneuploides. En general, las poblaciones celulares aneuploides así como también las diploides con un alto grado de proliferación (S-G2/M) tienen correlación pronóstica en diversas enfermedades malignas.

En el terreno de hematología clínica y específicamente en el campo del tratamiento de leucemias, el interés por cuantificar células progenitoras (Stem Cells CD34+) estriba en su potencial para restituir la capacidad hematopoyética de pacientes que han estado sujetos a quimioterapia mielosupresiva. Es importante conocer el número de células que se infunden a un paciente, correlacionándolo con el elemento clonogénico, este dato parece ser crítico para determinar el éxito o fracaso del procedimiento. Por ello, ha sido necesario desarrollar métodos que permitan cuantificar el número de células progenitoras Stem Cells en forma puntual y confiable, la Citometría de Flujo es actualmente la metodología que cumple ambos requisitos.

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) es un desorden clonal adquirido en el cual la proliferación monoclonal de células hematopoyéticas anormales conduce

a un aumento de la susceptibilidad al complemento homólogo. Las células HPN son característicamente deficientes en proteínas ancladas en la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los antígenos CD55 y CD59, quienes son cruciales en la regulación de la citólisis mediada por el Complemento, están disminuidos en estas células, así como otros marcadores de superficie. El uso de la técnica de Citometría de Flujo, para realizar la determinación de éstos antígenos, permite independizar el análisis de las transfusiones recibidas por el paciente previamente al estudio.

FIG3: Citómetro en el laboratorio de análisis clínicos



Inmunología

Mediante la Citometría de Flujo se pueden determinar deficiencias predominantes de anticuerpos y fallas de activaciones celulares que permiten realizar el diagnóstico y seguimiento de inmunodeficiencias primarias, como la Inmunodeficiencia Combinada Severa con ausencia de Linfocitos T maduros, Síndrome de Hiper-IgM, donde por falla del CD40 ligando no se realiza el swich isotópico, defectos de la función de fagocitos como en la Enfermedad Granulomatosa Crónica o la Detección de Defectos de las Vías de Activación de Apoptosis en Linfocitos. También, permite el seguimiento de pacientes inmunosuprimidos post-transplante y la fácil determinación de HLA-B27 que se asocia estadísticamente al aumento de susceptibilidad a espondiloartropatías seronegativas.

El Cross-Match contra donante permite detectar la presencia de anticuerpos preformados en el suero del paciente contra moléculas de HLA-I y HLA-II del donante. Este es un estudio imprescindible de realizar frente a un transplante como el renal, dado que estos anticuerpos llevan a la pérdida inmediata del órgano transplantado. La técnica de Citometría de Flujo es actualmente de referencia, ya que no sólo detecta todos los anticuerpos anti-HLA presentes en el suero del receptor, sino que además el grado de sensibilidad alcanzado es mucho mayor al de otras técnicas, por lo cual se torna imprescindible en la evaluación de pacientes hipersensibilizados y retransplantados.

Tabla 1: Principales aplicaciones clínicas de la Citometría de Flujo

Inmunodeficiencia adquirida (HIV)	Monitoreo de poblaciones linfocitarias T
	Helper (CD3+CD4+) y citotóxicas(CD3+CD8+)
	Reconstitución inmunológica (CD45RA, CD45RO, CD38, CD62L...)
Hematología	Diagnóstico, clasificación y seguimiento de Leucemias y Linfomas
	Detección de Enfermedad Mínima Residual
	Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
	Cuantificación de Stem Cells (CD34+)
	Determinación de DNA, ciclo celular y ploidías
	Activación y agregación plaquetaria
	Monitoreo de terapias con anticuerpos monoclonales
Inmunología	Cross match
	Diagnóstico y seguimiento de inmunodeficiencias congénitas (Combinada severa, syndrome de Hiper IgM...)
	Proliferación celular
	Citoquinas intracitoplasmáticas
	Citoquinas solubles en plasma o suero (CBA multiplexing)
	Actividad fagocítica
	Recuento y activación de basófilos
	Apoptosis
	Moléculas de adhesión
	Recuento y activación de basófilos
	Recuento de leucocitos residuales en bolsas de concentrados de plaquetas y/o eritrocitos
	Seguimiento de pacientes inmunosuprimidos post-transplante
	Determinación de HLA-B27
	Métodos funcionales post activación

Nuevas Aplicaciones Clínicas: Multiplexing mediante Citometric Bead Array

Hasta ahora hemos visto que mediante la Citometría de Flujo podemos analizar las muestras que presenten partículas o células aisladas marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos. En los últimos años, se ha desarrollado una nueva metodología llamada Citometric Bead Array (BDTM CBA) que permite detectar y cuantificar en una misma muestra varios tipos de analitos solubles por Citometría de Flujo en una sola marcación. Esta técnica consiste en aportar los elementos particulados en forma de perlas plásticas fluorescentes de unos 6 micrones que se recubren con anticuerpos monoclonales de captura. Al incubar este sistema con el suero o plasma del paciente se une el antígeno correspondiente y se revela con un segundo anticuerpo de captura marcado con un fluorocromo distinto al usado por las partículas. El principio es el de un sistema de ELISA Sandwich sobre las partículas plásticas ¿Cual sería la ventaja? La ventaja es que al mismo tiempo se pueden usar grupos de partículas con distinta intensidad de fluorescencia interna, recubiertas por distintos anticuerpos de captura y así formando un ensayo múltiple donde podemos medir, por ejemplo, 6 analitos distintos con 50 microlitros de muestra en un mismo tubo. La cuantificación se realiza mediante la extrapolación de los datos sobre curvas de calibración realizadas con diluciones de soluciones estándares de cada uno de los analitos. Estos valores son procesados por un programa especialmente desarrollado para generar las curvas de calibración, extrapolar los datos de las muestras e informar directamente el resultado en pg/mL. Por ejemplo, para



evaluar las vías de Th1/Th2 se puede medir al mismo tiempo en una muestra de plasma los valores de IL-2, IL4, IL6, IL10, TNF e IFN γ .

Actualmente, están disponibles los ensayos flexibles donde se pueden elegir las combinaciones de reactivos que se necesiten, utilizar simultáneamente y así armar el conjunto de determinaciones según los requerimientos del laboratorio, con la posibilidad de medir más de 20 analitos al mismo tiempo.

Esta metodología permite detectar y cuantificar simultáneamente múltiples antígenos y anticuerpos solubles, con lo cual abre las puertas a toda una nueva gama de mediciones para la Citometría de Flujo, dependiendo de la producción de nuevos reactivos para esta aplicación.

Sorting: separación celular

Mediante la tecnología de Citometría de Flujo es también posible realizar una separación física de las células de interés, una vez identificadas por sus marcadores específicos. Esto permite recolectar en un tubo individual células de una misma característica, ya sea para realizar cultivos, estudios funcionales (Quimerismo post-transplante) o enriquecer la muestra para poder realizar otras técnicas como PCR, FISH, etc.

Hay principalmente dos metodologías de separadores celulares: los mecánicos y los electromagnéticos.

La separación mecánica consta de un tubo de captura que toma las células de interés, luego de que han atravesado el láser y se han identificado como positivas para la población que se quiere separar. En este caso, se puede aislar una sola población a la vez con una velocidad máxima de 300 células separadas por segundo. Este dispositivo puede ser utilizado en algunos de los modelos de uso en el laboratorio clínico.

La separación electromagnética requiere de citómetros especiales y más complejos, donde la separación se realiza mediante un flujo en aire con formación de gotas que se cargan eléctricamente y que al atravesar un fuerte campo magnético se separan por deflexión. Este principio permite una separación de hasta cuatro poblaciones diferentes en forma simultánea y a muy alta velocidad (más de 50.000 células por segundo). Estos equipos desarrollados inicialmente para investigación en terapia celular y Stem cells, ya se están introduciendo en algunos laboratorios clínicos que separan las células con fenotipo anormal para luego seguir los distintos estudios con una población aislada y purificada.

El futuro

La tendencia actual en Citometría de Flujo para los nuevos equipamientos, como reactivos disponibles, es

lograr una medición simultánea de la mayor cantidad de características celulares, enriqueciendo la información que se pueda extraer en cada caso. Por eso se ve cierta migración hacia equipos que pueden medir 4, 6 u 8 fluorocromos al mismo tiempo, además de las medidas relativas de tamaño y complejidad interna. De la mano con este crecimiento multiparamétrico se está evidenciando la gran necesidad de mejorar los sistemas, programas y protocolos de control de calidad para validación de datos, que deberán ser más sistemáticos, por los requerimientos del aumento de la complejidad de los citómetros y las mediciones.

Aunque la Citometría de Flujo ya es de uso común en nuestros laboratorios, es una disciplina que está todavía en desarrollo y que seguirá creciendo en sus aplicaciones dentro del laboratorio de análisis clínicos así como en investigación clínica y básica.

Referencias:

- Guidelines for performing Single –Platform absolute CD4+ T-cells determinations with CD45 gating for persons infected with the Human Immunodeficiency Virus. CDC MMWR January 31 2003 / Vol 52 / N°RR-2
- Clinical flow cytometric analysis of neoplastic hematolymphoid cells; Approved guideline- Second edition. Clinical Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). H43-A2, Vol 27, N°11.
- Report on the second Latin American Consensus Conference for flow cytometry immunophenotyping of hematological malignancies. Cytometry B, 70B: 39-44 (2005)
- Practical flow cytometry - 4th edition 2003 Howard Shapiro – Editorial Willey-Liss

