

# APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

*Dr. Enrique Gutiérrez Boldt<sup>1</sup>, Dra. Cecilia Sepúlveda Carvajal<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Becado de Programa de Formación en Laboratorio Clínico, Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

<sup>2</sup> *Profesor Asociado de Medicina, Unidad de Inmunología, Departamento de Medicina, Hospital J.J. Aguirre.*

## RESUMEN

Se analiza la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el diagnóstico, evolución y pronóstico de diferentes patologías. Se analiza una breve descripción del aparato y sus fundamentos técnicos. Se analizan los usos más frecuentes, principalmente en pacientes VIH/SIDA, otras inmunodeficiencias y en el estudio de leucemias. Finalmente se analizan otras líneas de aplicación del citómetro de flujo en diferentes estados de investigación y estandarización.

## PALABRAS CLAVES:

Citometría de Flujo (CF), Anticuerpos Monoclonales (Ac Mc), Fluorescencia (F), Antígenos (Ag), Anticuerpos (Ac).

## SUMMARY

### CLINICAL APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY

The clinical utility of Flow Cytometry in the diagnosis, evolution and prognosis of different diseases are analyzed. A brief description of the apparatus and

its operating principles is made. Its current use is explained, principally in the study of lymphocyte subpopulations in HIV/AIDS, and other immunodeficiencies, and the study of leukemias. Finally a few of the current applications of Flow Cytometry which are in different stages of investigation and standarization are commented.

## KEY WORDS

Flow Cytometry (CF), Monoclonal Antibodies (Ac Mc), Fluorescent (F), Antigens (Ag), Antibodies (Ac).

La Citometría de flujo (CF) es una tecnología de punta, que permite analizar en el laboratorio, «una a una» las células en suspensión, a medida que van «desfilando» frente a un rayo láser y determinar sus características fisicoquímicas (tamaño, complejidad interna, contenido de ácidos nucleicos, etc.), así como sus características fenotípicas de acuerdo a sus antígenos (Ag) de membrana los que son marcados con anticuerpos monoclonales (Ac Mc) fluorescentes.

En contraste con otras técnicas, como la Microscopía de Fluorescencia, la CF ofrece grandes ventajas ya que es un método objetivo, multiparamétrico, de alta reproductibilidad y con una gran optimización en cuanto a tiempo de procesamiento de la muestra (un minuto) y número de células analizadas por muestra (diez mil a un millón de células).

La CF constituye un importante elemento técnico de avance en lo que se refiere al estudio y diagnóstico de múltiples enfermedades. Dentro de éstas, las aplicaciones actuales más utilizadas y estandarizadas son el recuento de subpoblaciones

linfocitarias en pacientes VIH/SIDA, y el apoyo al diagnóstico de síndromes proliferativos neoplásicos hematológicos. Existen en investigación otras múltiples aplicaciones que aún se encuentran ya sea en estudio o en etapa de estandarización.

El Citómetro de Flujo consta de los siguientes componentes:

### 1. Sistemas de fluidos y cámaras:

Es un sistema de flujo hidrodinámico que a través de diferencias de presión entre el buffer y el líquido de la muestra, obliga a las células a pasar una por una a la cámara de detección o ventana.

### 2. Sistema Óptico y de Fotodetectores:

Consta de un rayo láser de Argón cuya emisión máxima de luz se produce a 488 nm. Esta, al incidir sobre cada célula, determina su dispersión en dos sentidos: una dispersión frontal que determina tamaño relativo e índice de refracción, llamado Forward Scatter o FSC, y una dispersión lateral en 90° que determina granularidad relativa y complejidad interna, llamado Side Scatter o SSC. Existen además tres o más canales que detectan Ac Mc marcados con diferentes fluorocromos. Los fluorocromos más usados son Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, 520 nm), Phycoeritrina (PE, 575 nm), Peridium Clorofil protein (Per CP, 650 nm) y Ioduro de Propidio (IP, 585 nm).

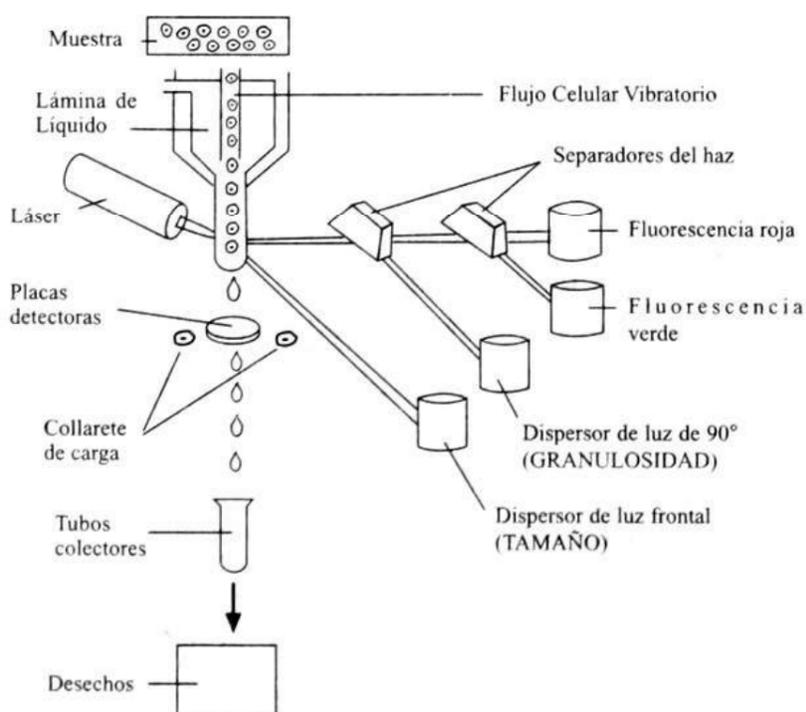


Figura 1

La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al compuesto fluorescente unido a la célula o partícula (figura 1).

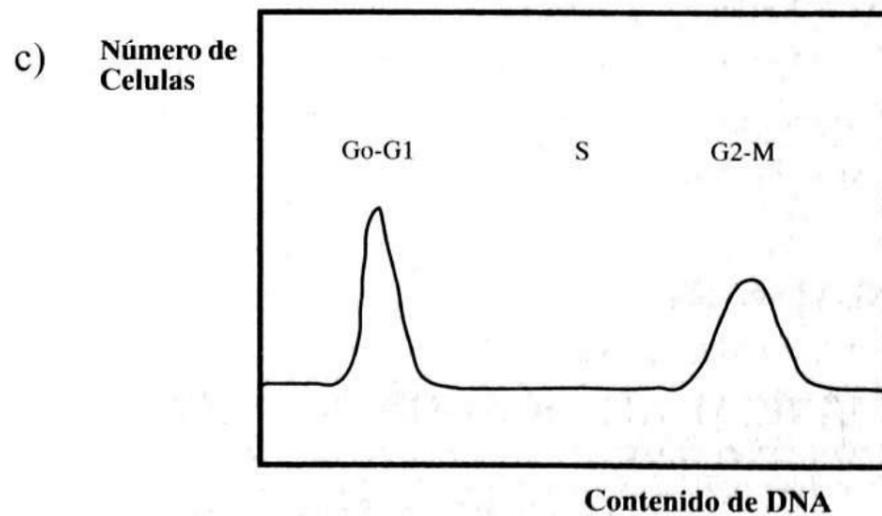
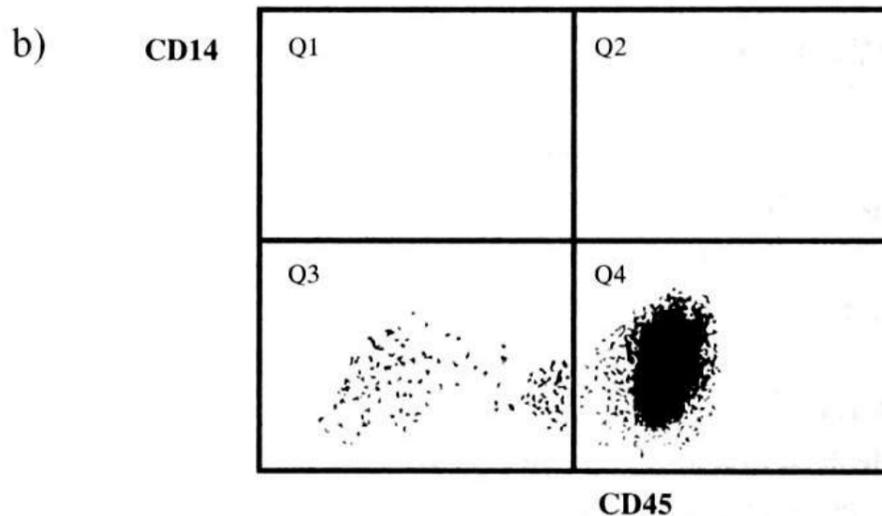
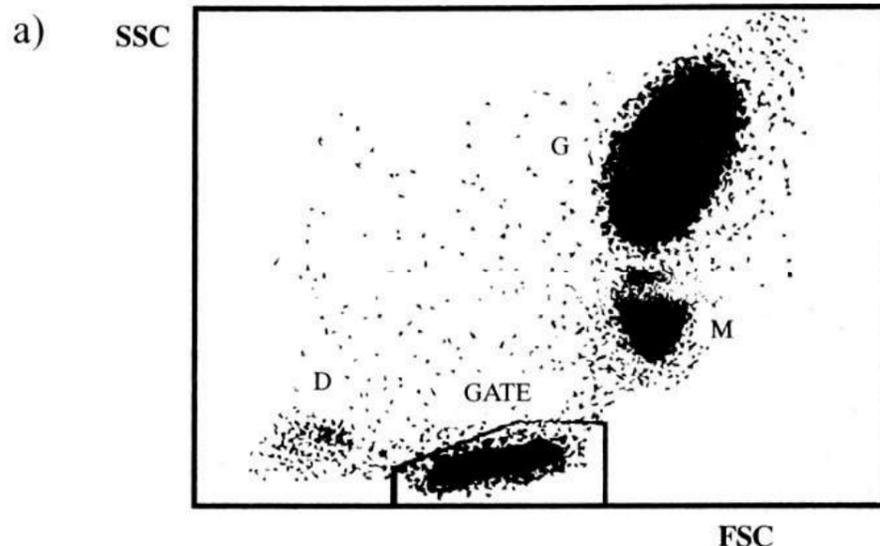


Figura 2

### 3. Sistema Computacional y Software:

A través de tubos fotomultiplicadores, la luz detectada es transformada en pulsos de energía eléctrica que son integrados por el computador ofreciendo la información final a través de diferentes representaciones gráficas (figuras 2a, 2b, 2c).

Los canales de detección se pueden expresar en forma lineal o logarítmica, siendo esta última mejor en la separación de grupos celulares según fluorescencia.

Existen diferentes instrumentos de calibración como las CALIBRATE BEADS, que son kits comerciales de microesferas artificiales marcadas con FITC y PE, y sin marcar, que permiten establecer poblaciones de referencia, a los cuales se aplica la compensación de fluorescencia necesaria para establecer los cuadrantes estadísticos adecuados <sup>(1)</sup>.

Las muestras son de sangre total y no requieren de un volumen específico; en general se mantienen los volúmenes convencionales de pediatría (0.5 ml) y de adultos (4 ml.). Esta oscila entre  $5 \times 10^5$  -  $2 \times 10^7$  células por ml. ( $x = 1 \times 10^7$ ). Idealmente deben llevar EDTA K3 como anticoagulante porque permite realizar simultáneamente el recuento hematológico y el análisis por citometría <sup>(2)</sup>. Además, permite el procesamiento hasta 30 horas después de recolectada. La relación debe ser de  $1.5 \pm 0.15$  mg EDTA K3/ ml de sangre. En cuanto a requisitos y cuidados de las muestras, éstas deben estar bien identificadas para lo cual existe un código específico de referencia. Pueden mantenerse entre 18 y 22°C hasta su procesamiento, realizando el recuento hematológico antes de 6 horas y el análisis citométrico antes de 30 horas. Si son muestras derivadas de otro lugar éstas deben ser enviadas con gran rapidez (menos de 6 horas) y deben venir con el recuento hematológico correspondiente. Es importante señalar que puede haber variaciones dentro del mismo individuo durante el mismo día, de hasta un 10% en los resultados.

No es adecuado procesar muestras que no cumplan con estos requisitos y que además presenten hemólisis, lipemia, coágulos, que sean escasas, que hayan sido congeladas (por la baja viabilidad de células mononucleares), o mantenidas a temperaturas sobre 30°C (se produce lisis celular importante) o a

temperaturas menores de 10°C (que produce una alteración conformacional de los receptores y por tanto altera la unión Ag - Ac) <sup>(3)</sup>.

Existen además drogas y factores biológicos que se deben considerar en la interpretación de los resultados y entre estos se describen:

#### DROGAS

AZT	>fragilidad granulocitos	>resolución por CF
Cefalosporinas	>autofluorescencia celular	>falsos + sin control -
Daunorrubicina	>autofluorescencia celular	>falsos + sin control -
Nicotina	>recto de linfocitos	>número absoluto
Corticoides	>marginalidad linfocitaria	Sobrestima gravedad
	>recuento CD 4	clínica del paciente

#### FACTORES BIOLÓGICOS:

Reticulocitosis	>lisis g. rojos, >recto blancos	>resolución por CF
Mielofibrosis		
Esferocitosis		
Metástasis Médula		
Osea (MO)		
Ejercicio extremo	>marginalidad linfocitaria	>valores absolutos
Variación diurna	+/- 10% de linfocitos	varían subpoblaciones
Edad, sexo, raza	debe determinarse	establecer rangos

### APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

A continuación se enumeran algunas de las principales aplicaciones clínicas actuales de la CF (Tabla 1).

Tabla 1

#### Aplicaciones Clínicas Actuales de la Citometría de Flujo

- Estudio de subpoblaciones celulares (por ejemplo, linfocitos CD4 - CD8)
- Inmunofenotipificación de Leucemias y linfomas
- Análisis del Ciclo Celular y Contenido de DNA - RNA
- Análisis de Reticulocitos
- Determinación de Stem Cells (Procount)
- Estudio de Fagocitosis
- Estudio de Viabilidad Celular
- Apoptosis
- Análisis de Citoquinas celulares
- Estudio de Tumores Sólidos
- Monitorización de Quimioterapia

En esta revisión analizaremos los primeros nueve métodos de estudio por encontrarse más estandarizados, principalmente los dos primeros.

## ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES CELULARES:

El estudio de subpoblaciones celulares se basa en la identificación de sus antígenos de membrana CD, éstos son glicoproteínas ubicadas en su parte externa, y difieren de un grupo a otro de células, permitiendo así su discriminación (CD = Cluster of differentiation o grupos de diferenciación). Estos antígenos CD son detectados usando diferentes Ac Mc marcados con diferentes fluorocromos <sup>(4)</sup> (Tabla 2).

Tabla II

### Principales marcadores de subpoblaciones celulares

CD45+	Todos los leucocitos y Stem celis
CD14+	Monocitos, Macrófagos, Granulocitos
CD45+CD14-	Linfocitos totales
CD3+CD4+	Linfocito T helper
CD3+CD8+	Linfocitos T citotóxicos
CD3-CD19+	Linfocitos B
CD3-CD8+CD16+CD56+	Linfocitos NK
CD3-CD4+CD14+CD45+	Monocitos
CD3+HLA-DR	Linfocitos T activados
CD38+	Células pre B, cél. plasmáticas, timocitos.

También se utilizan los controles de Anticuerpos de Isotipo gamma 1 y 2 que son específicos de antígenos (Ag) no presentes en leucocitos humanos y éstos permiten evidenciar la tinción no específica de anticuerpos (Ac) por el receptor Fc de inmunoglobulinas (figura 3a).

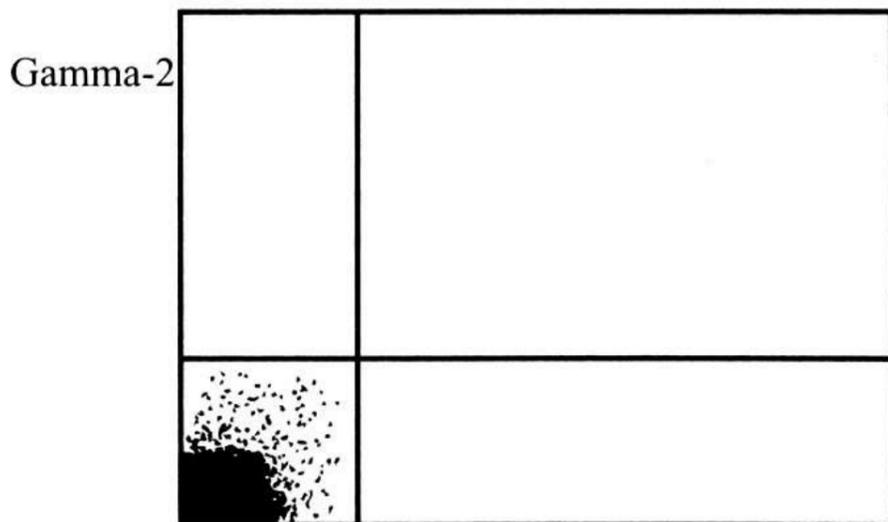


Figura 3a

Existen estándares mínimos en relación a la muestra como tal y éstos son: un mínimo de eventos detectables (por ej. 500 linfocitos por muestra en el estudio de subpoblaciones linfocitarias), una pureza óptima superior a 90% en la ventana de linfocitos o GATE y una recuperación superior a 95% de los linfocitos totales. Además, muestras que no tengan una adecuada separación de subpoblaciones o más de 10% de debris y glóbulos rojos pueden ser rechazadas <sup>(5)</sup>. Finalmente analizando los diferentes Ag CD, se pueden determinar las diferentes subpoblaciones (figura 3b, 3c).

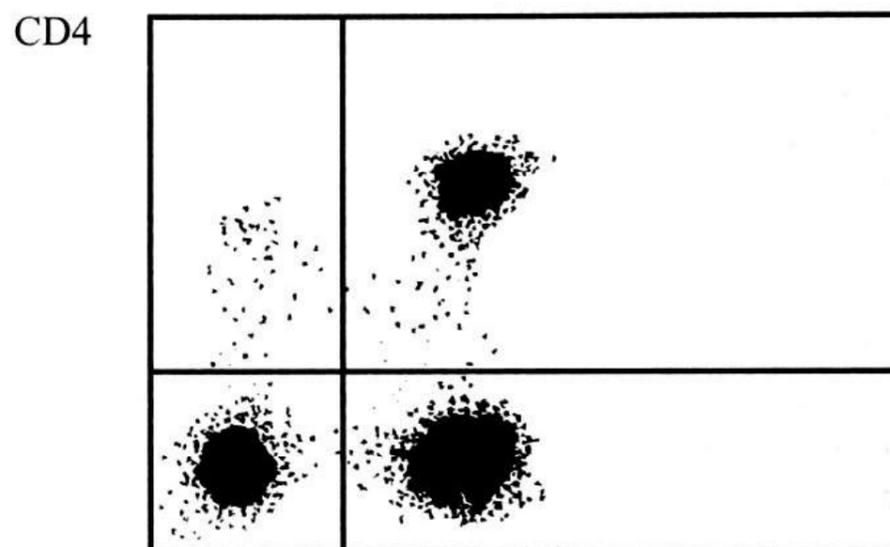


Figura 3b

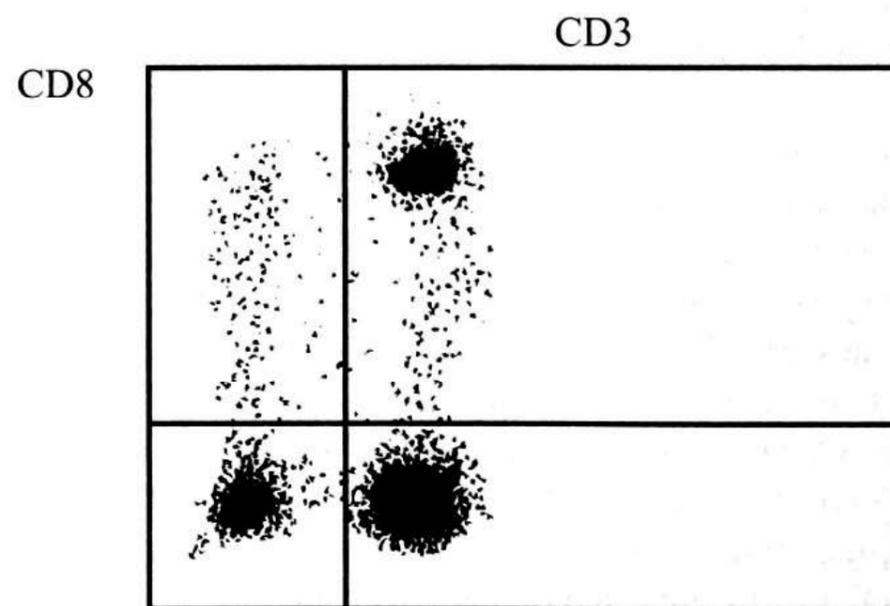


Figura 3c

A continuación se enumeran en forma general las principales alteraciones observadas en las subpoblaciones celulares y su relación con grupos específicos de enfermedades inmunológicas (Tabla 3).

Tabla 3

**Alteraciones de subpoblaciones celulares asociadas a determinados grupos de enfermedades inmunológicas.**

1. Inmunodeficiencias Congénitas o Adquiridas (con CD4 bajo):
  - Inmunodeficiencias Combinada Severa (SCID)
  - Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)
2. CD8 muy aumentados:
  - Enfermedades Autoinmunes
  - Reacciones Inmunes:
    - \* Enfermedad de Injerto contra huésped (GVHD)
    - \* Rechazo de trasplantes
3. CD8 aumentados:
  - LES en tratamiento corticoideal
4. CD8 disminuídos:
  - LES activo sin tratamiento
5. CD3+ HLA-DR: LT activados en SIDA y otras alteraciones autoinmunes
6. SIDA:
  - Pronóstico Clínico (CD4 disminuyen (8 a 24 meses previo a las manifestaciones clínicas).
  - Monitorización terapéutica
  - Criterios para iniciar terapia profiláctica
  - Criterios para iniciar terapia antirretroviral

Tabla 4.

**Marcadores más utilizados en el estudio de Leucemias**

LB	CD19, CD20, CD22
LT	CD3, CD5, CD7
Mieloide	CD13, CD33
Sin asociación	HLA-DR, CD10

Esta técnica complementa el análisis morfológico citoquímico u otros estudios de inmunofluorescencia adicional. Requiere además de un umbral mínimo de expresión según el Ag en estudio que corresponda a > 20-30% de las células.<sup>(7)</sup>

En fenotipos indeterminados se puede asociar el análisis de expresión de Mieloperoxidasa y Ag CD3 citoplasmático y/o de superficie<sup>(8)</sup>.

CD10 a Ag común de LLA (CALLA) se encuentra en LLA-B, Linfomas, Mielomas, epitelio renal, fibroblastos y granulocitos.

CD19 está en LB en todos sus estadios y se pierde en su diferenciación a células plasmáticas.

CD20 está en LB, apareciendo más tardíamente que CD 19 se ha detectado en CD5 se expresa tempranamente en timocitos y LT maduros. Se ha visto en subpoblaciones de LB en sangre, tonsilas y ganglios linfáticos. Lo expresan la mayoría de LLA-T y LLC-B.

CD3 es parte del receptor de células T (TCR) en LT maduros, no es frecuente pero su hallazgo es determinante en LLA-T.

CD22 se expresa en el citoplasma de todos los LB y en la superficie de LB maduros y Leucemias de linaje B (Leucemia de Células Peludas, Linfoma de Células B).

CD7 se expresa en LT, NK y células progenitoras mieloides. Se ven en la mayoría de LLA-T.

CD33 está en neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos. No se encuentra en linfocitos, eritrocitos ni plaquetas. Se expresa en todos los precursores mieloides.

HLA-DR es parte del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC- II). Está en células progenitoras, LB, LT activados NK activados, monocitos y macrófagos. Puede estar expresado en todas las leucemias.

## INMUNOFENOTIPICACIÓN DE LEUCEMIAS:

Las Leucemias son un grupo heterogéneo de alteraciones producto de la proliferación de una o más líneas celulares hematopoyéticas. Su clasificación es fundamental ya que los tratamientos difieren en forma importante entre sí. Es conocida la Clasificación FAB que se basa en estudios morfológicos y citoquímicos, distinguiendo seis grupos mieloides (M1 a M6) y tres linfoides (L1 a L3). Con las nuevas técnicas se ha incluido otros dos grupos mieloides (M0 y M7). Existe la posibilidad de inmunotipificar las Leucemias Agudas y sus grupos basado en la expresión de sus Ag de superficie. Para ello se utiliza un panel de Ac Mc que detecta dichos Ags en los siguientes linajes: Linfoide B, Linfoide T, Mieloide e Indiferenciado (Tabla 4). La tarea no siempre es fácil ya que se produce la «expresión aberrante de Antígenos» en que Ag Linfoides pueden ser expresados en Leucemias Mieloides y viceversa. Los porcentajes de expresión de cada Ag también varía, como CD33 en el 85% y CD13 en el 60% de casos de Leucemias Mieloides Agudas (LMA)<sup>(6)</sup>.

CD13 está en neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos. No en linfocitos, eritrocitos y plaquetas. Se expresa en la mayoría de LMA. Puede ser aberrante en Leucemias Linfoides <sup>(9)</sup>.

### ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR Y CONTENIDO DNA-RNA:

Evalúa la cantidad relativa de DNA presente en el núcleo de la célula. El fluorocromo más utilizado es PI que se une al DNA celular en todos los estadios de división celular. La intensidad de la luz emitida por los núcleos de las células es directamente proporcional al contenido de DNA. La célula puede ser diploide, tetraploide o haploide.

Dependiendo del tipo de tejido, varía la proporción de células en el ciclo celular. Este considera las siguientes fases: Go o estado de reposo, G1 o fase de división en respuesta a señales específicas, S o fase de síntesis donde se duplica el contenido de DNA celular, G2 o fase de preparación para la división celular en base de síntesis de determinadas proteínas que actúan como señales y M o Mitosis donde la célula tetraploide forma dos células hijas diploides que entran en fase Go. Go y G1, al igual que G2 y M no se pueden diferenciar en el histograma (sobreposición) ya que poseen el mismo contenido de DNA (figura 3).

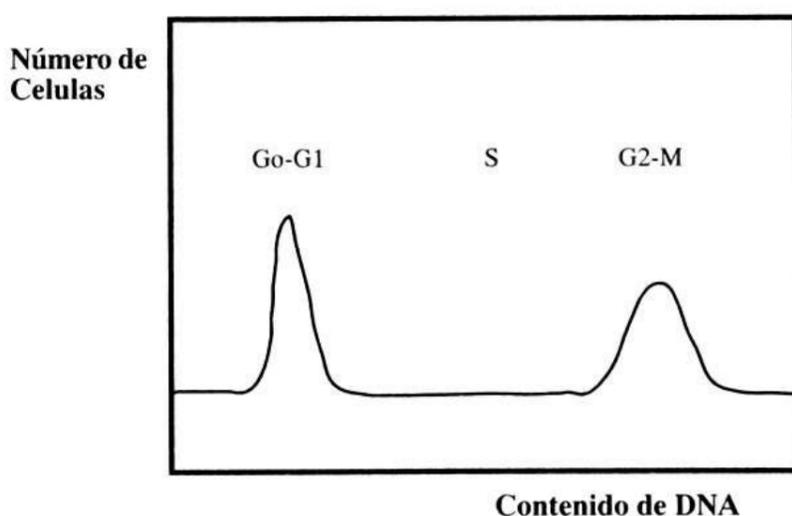


Figura 3

Integrando el área bajo la curva se puede determinar el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular <sup>(10)</sup>.

Las células en fase S tienen una cantidad de DNA entre 1x y 2x donde x es la cantidad normal de

DNA, y por esto la fluorescencia cae entre ambos peaks (Go-G1 y G2-M).

Las células de un tejido de baja proliferación poseen un bajo porcentaje de células en fase S, a diferencia de tejidos con alta proliferación. Las células neoplásicas pueden presentar grandes cambios, mostrando una intensidad de fluorescencia anormal por la variación en el contenido de DNA. Una medida cuantitativa del grado de aneuploidía se puede calcular dividiendo el canal del peak Go/G1 aneuploide por el canal Go/G1 diploide, lo que se denomina INDICE DE DNA. Las muestras para medición de DNA se pueden obtener de tejido fresco, tejido fijado en parafina y por aspirado con aguja fina siendo ésta última la de mejor precisión y reproducibilidad <sup>(11)</sup>.

Uno de los programas existentes actualmente es el Software Cell FIT diseñado para el análisis de DNA. Provee doble discriminación y 5 modelos de histogramas. Los resultados se expresan en porcentajes e Índice de DNA. Existe además un parámetro denominado DDM (Doublet Discrimination Module) que permite diferenciar dobletes de una célula con alto nivel de fluorescencia (por ej. doblete Go/G1 de singlete M). Para esto mide el ancho (FLX-W) o el área (FLX-A) de la señal de fluorescencia (X) permitiendo discriminarla <sup>(12)</sup>.

### ANÁLISIS DE RETICULOCITOS:

Los reticulocitos son glóbulos rojos jóvenes que aún contienen organelos como ribosomas y mitocondrias (RNA y DNA residual) lo que puede permitir su diferenciación con GR adultos o maduros. Retic COUNT es un Software que utiliza Thiazole Naranja, el que une al RNA y DNA formando un complejo nucleótido reactivo que absorbe luz a 475 nm y emite luz a 530 nm <sup>(13)</sup>. Permite un rápido recuento de reticulocitos en muestras de sangre total. Se usan dos tubos, uno teñido con fluorescencia y otro sin teñir; ambos utilizan EDTA K3 lo que permite su análisis hasta 48 horas después de recolectada la muestra. También posee CALIBRATE beads para control de calidad. El método estandar usa Nuevo Azul de Metileno (tinción vital), y se realiza un recuento en microscopía de luz que ocupa mucho

tiempo en su procesamiento y está sujeta a gran variabilidad del observador. Retic COUNT en cambio, tiene grandes ventajas en relación al tiempo (un minuto por muestra). Además los recuentos tienden a ser más altos y por tanto sus resultados mucho más precisos.

#### DETERMINACIÓN DE STEM CELLS:

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de MO del paciente o un dador con estudio de crossmatch de HLA, es usado en forma creciente en el tratamiento de enfermedades sanguíneas, leucemias y anormalidades genéticas. Al usarse en leucemias se eliminan las células hematopoyéticas con altas dosis de quimioterapia y son reemplazadas por células progenitoras normales que repoblan la MO. Además en tumores sólidos post quimioterapia se puede utilizar este procedimiento, lo que ha mostrado larga sobrevivencia en algunos tipos de cáncer. Aún se encuentra en estudio la aplicación para hemoglobinopatías, inmunodeficiencias y anemia aplásica<sup>(15)</sup>. Utilizando factores estimuladores de colonias de granulocitos y monocitos (G-CSF y GM-CSF) junto con quimioterapia, la sangre periférica se ha constituido en una fuente excelente de Stem Cells, menos traumática, y acorta el tiempo en proveer adecuados niveles de Stem Cells en trasplantes autólogos o alogénicos. En la década del 80 se descubrió la molécula CD34 presente en células hematopoyéticas inmaduras, y en todas las colonias formadoras de células en MO y sangre periférica, incluyendo células progenitoras uni o pluripotenciales. La frecuencia relativa de CD34+ es del 1-4% de las células mononucleares en MO normal, y <0.1% en sangre periférica. Para requerimientos en protocolos de trasplante cuyo umbral estimado es 2-5 x 10<sup>6</sup> células CD34+/kg de peso, la CF constituye un método rápido, eficiente, reproducible y cuantificable de stem cells. Es un método estandarizado que evita la variabilidad en los recuentos absolutos de diferentes muestras en base a un ensayo denominado TruCOUNT que determina volumétricamente el recuento absoluto de stem cells, mediante el uso de partículas fluorescentes contenidas en un pellet liofilizado para obtener rangos de

referencia ya que están en cantidad conocida por microlitro de muestra.

Los marcadores utilizados son CD45 - PerCP (se encuentra en todos los leucocitos pero posee diferente grado de expresión en las diferentes células progenitoras hematopoyéticas), CD34 - PE (determina la condición de Stem Cell), SSC (facilita la discriminación entre linfocitos y monocitos con Stem de todas las células nucleadas incluso GR nucleados, eliminando debris, GR maduros y plaquetas) (figuras 4a, 4b, 4c).

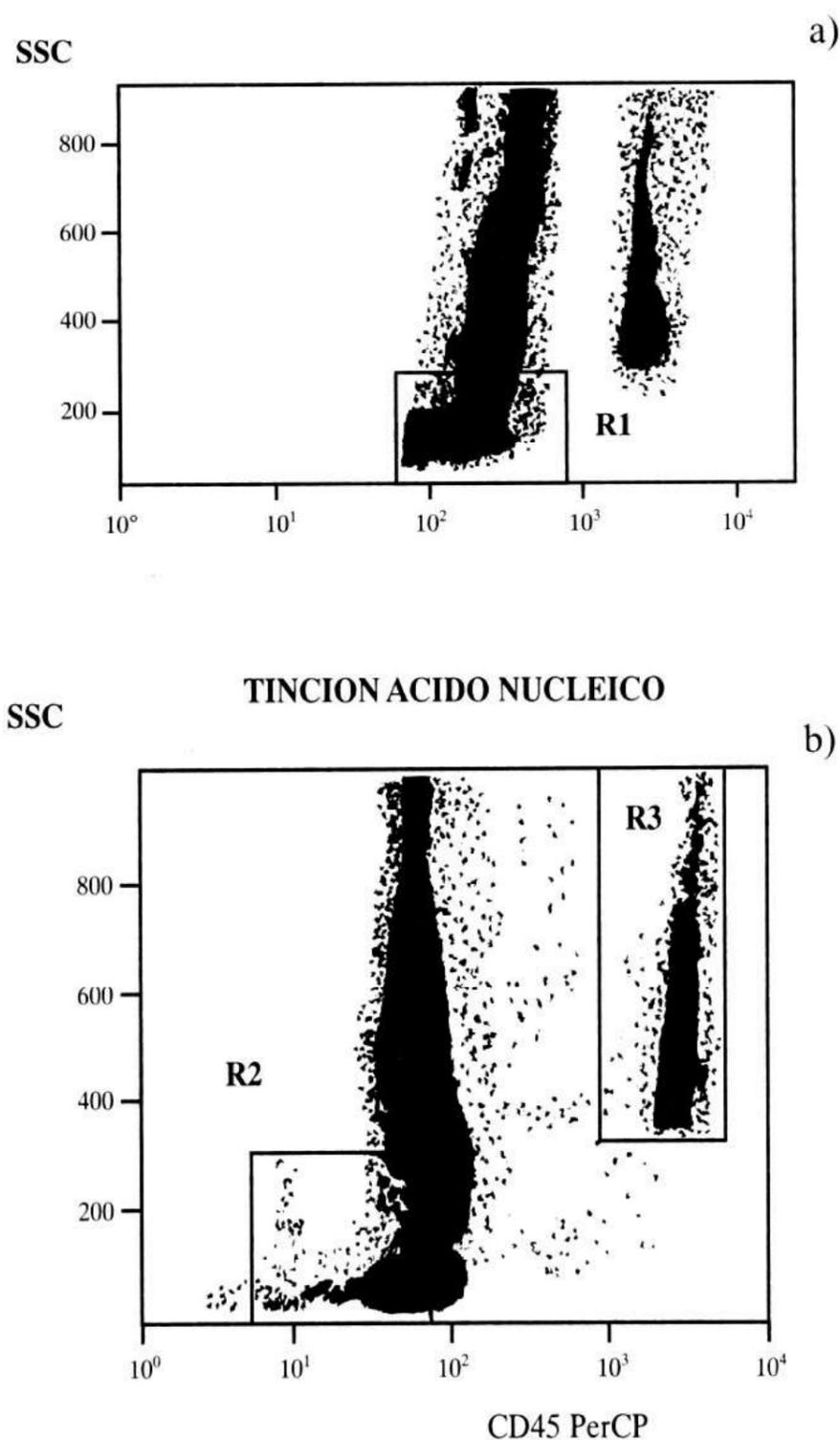


Figura 4

CD34 PE

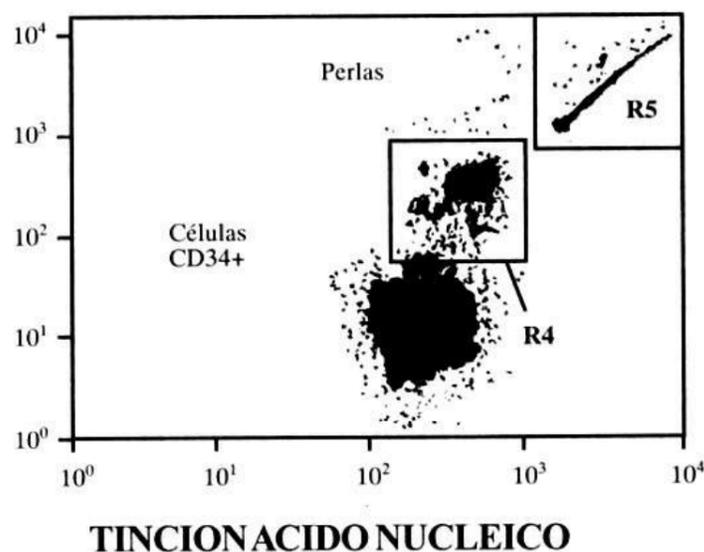


Figura 4

Esta combinación informa el recuento de células nucleadas y el número total de leucocitos CD45+.

Para obtener el número absoluto de CD34+ por microlito se divide el número de CD34 por el número de partículas fluorescentes y esto se multiplica por el número total de partículas y por un factor de dilución si procede <sup>(16)</sup>.

Ejemplos de cánceres manejados con este sistema incluyen Leucemias, Linfoma de Hodgkin y No Hodgkin, Mieloma Múltiple, Mama, Pulmón, Testicular, Neuroblastoma y Sarcomas.

## ESTUDIO DE FAGOCITOSIS

Existen kits como el PHAGOTEST, de determinación de actividad fagocítica de monocitos y granulocitos en sangre total y líquido sinovial (determinación cuantitativa). Contiene inmunoglobulina (Ig) marcada con FITC opsonizada por bacterias como la *Echerichia coli*. Determina el porcentaje de células que muestran fagocitos del total (ingestión de una o más bacterias por célula).

La fagocitosis se ve reducida en Artritis Reumatoidea (AR) y en cuadros sépticos. Se ha visto aumentada post terapia con Interferón - gamma y durante

c) infecciones virales. Defectos congénitos en donde la fagocitosis se encuentra alterada son: Enfermedad Granulomatosa Crónica, Deficiencia de glicoproteína de adhesión de leucocitos, Síndrome de infecciones recurrentes por hiper Ig E, Síndrome de Chediak Higashi, Déficit de gránulos específicos y Déficit de Mieloperoxidasa. Defectos adquiridos de los neutrófilos pueden verse en trauma, Diabetes Mellitus, Insuficiencia Renal, Alcoholismo e Infecciones.

Este kit permite diferenciar el efecto en términos del tipo celular (granulocitos, monocitos, macrófagos) y la fase alterada del proceso de fagocitosis (quimiotaxis, opsonización, ingestión o digestión). Como control positivo se utiliza un lipopolisacárido (LPS) en concentraciones de 1 - 10 g/ml post incubación por cinco minutos. Los factores críticos son: el grado de opsonización pH, temperatura y tiempo de incubación y la agitación de la muestra.

El kit contiene una solución de absorción de bacterias no ingeridas, una solución de tinción de DNA que excluye artefactos de agregación de bacterias o células (PI) y una solución de lavado que garantiza muy poca desviación estándar. El promedio de fluorescencia se correlaciona con el número de bacterias por cada muestra <sup>(17)</sup>.

## ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS:

La Apoptosis es el proceso de muerte celular programada, debido a cambios característicos morfológicos y biológicos en el ciclo celular. Es común en embriogénesis, involución de tejidos u órganos normales, reacciones inmunes citotóxicas, y en la etapa final de células diferenciadas <sup>(18)</sup>. Puede ser inducida por múltiples agentes incluyendo activadores fisiológicos, enzimas del shock térmico, toxinas bacterianas, oncogenes, quimioterapia, radiación UV y gamma. Finalmente son fagocitadas por células contiguas. Esta se caracteriza porque no hay alteración de la permeabilidad de la membrana celular, por la formación de cuerpos apoptóticos y por la fragmentación del DNA por DNAasas en fragmentos de 200 pares de bases <sup>(19, 20)</sup>. Es distinto a la necrosis

que ocurre por injuria celular con la consecuente lisis celular y liberación de componentes citoplasmáticos al microambiente que rodea a la célula producto de alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular con la consecuente inducción de una respuesta inflamatoria tisular intensa (figuras 5a, 5b).

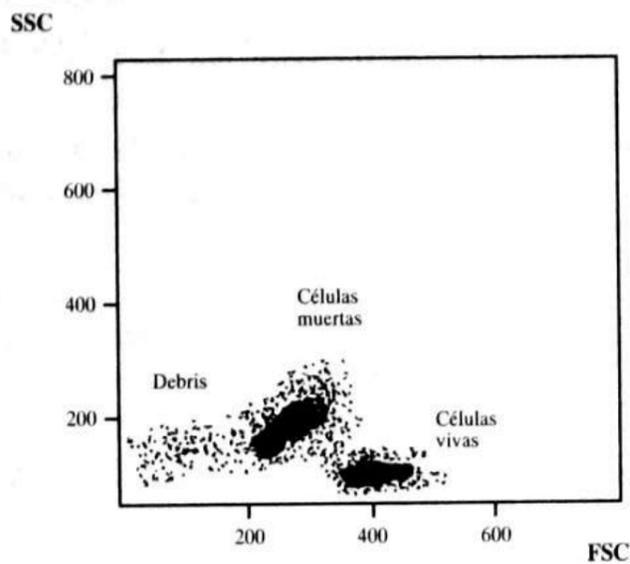


Figura 5a

**FL3-IP**

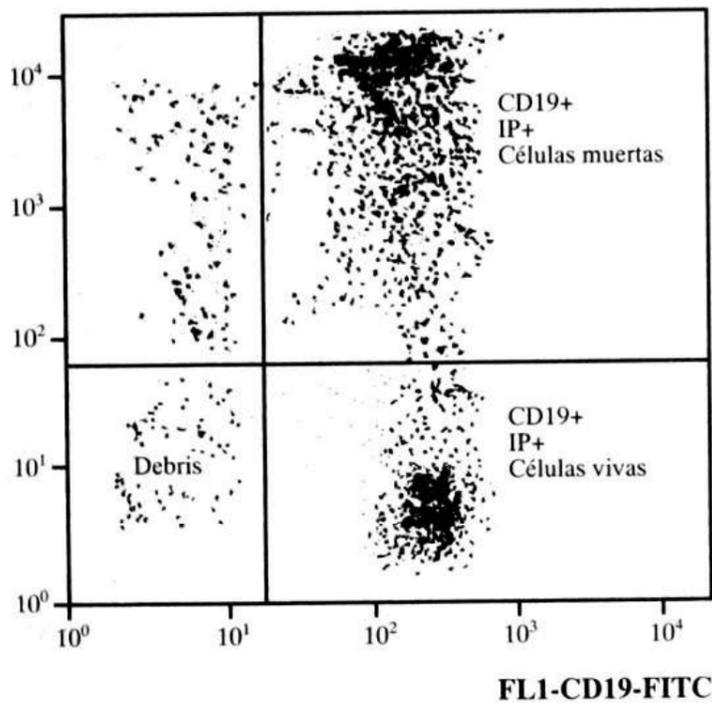


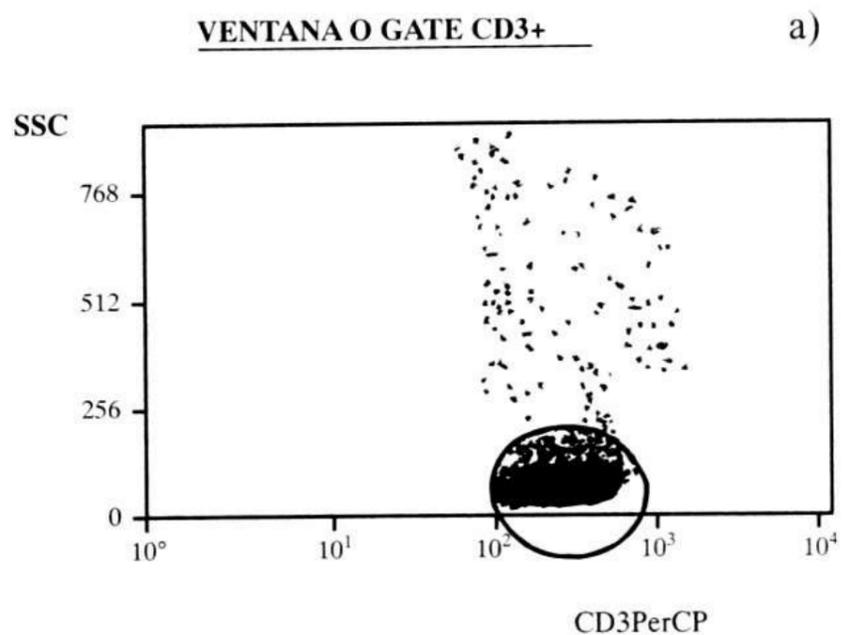
Figura 5b

**ESTUDIO DE CITOQUINAS INTRACELULARES:**

Las citoquinas son proteínas solubles que regulan el desarrollo, diferenciación y función de

una amplia variedad de células, y median en respuestas inmunes normales y patológicas. Las células T helper pueden ser definidas funcionalmente por las citoquinas que producen, existiendo respuestas TH1 con liberación de IL-2, INF gamma y TNF - alfa con acción sobre patógenos principalmente intracelulares (HIV), TH2 con liberación de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que regulan la respuesta inmune humoral contra patógenos extracelulares (parásitos). Se han identificado LT helper con respuestas mixtas <sup>(21)</sup>. Para el estudio por CF se utilizan muestras de sangre periférica en las que se obtienen células mononucleares por gradiente Ficoll-Hipaque. Estas son activadas por 6 horas con Ester de Forbol (PMA) que activa la proteína quinasa C intracelular, más Ionomicina que es un ionóforo de calcio que permite su entrada, asociado a Monensina que bloquea el transporte de proteínas hacia el espacio extracelular inhibiendo entonces la secreción de citoquinas entre otras proteínas. Luego se realiza marcaje de superficie con CD3-Per CP establecido un GATE de CD3+.

Estas son permeabilizadas con saponina realizando a posterior un marcaje intracitoplasmático con FITC y PE, que están unidos a las citoquinas que se desea estudiar <sup>(22)</sup>. Esto permite observar finalmente poblaciones TH1 y TH2 o mixtas (figura 6a, 6b, 6c).



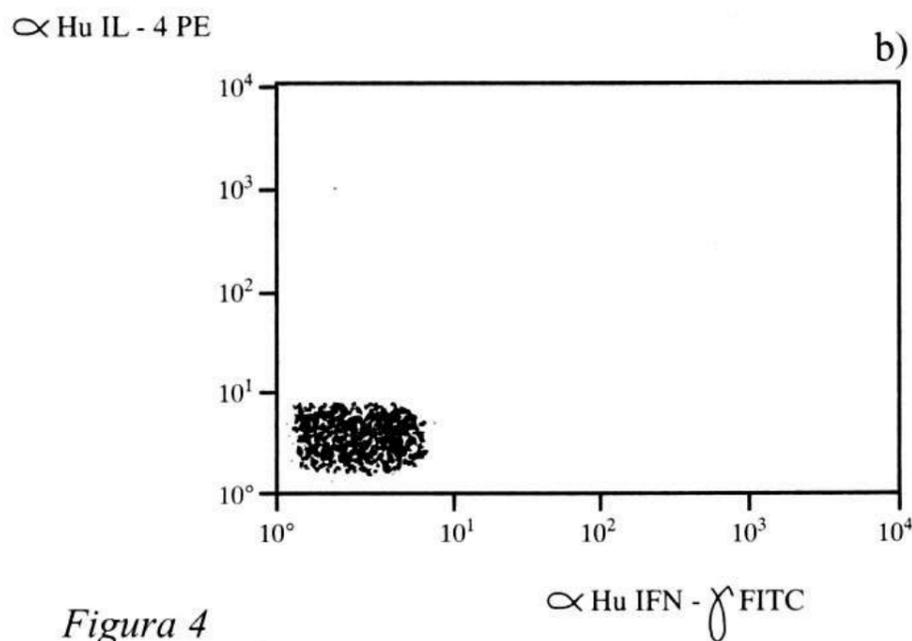


Figura 4

PMA+IONOMICINA

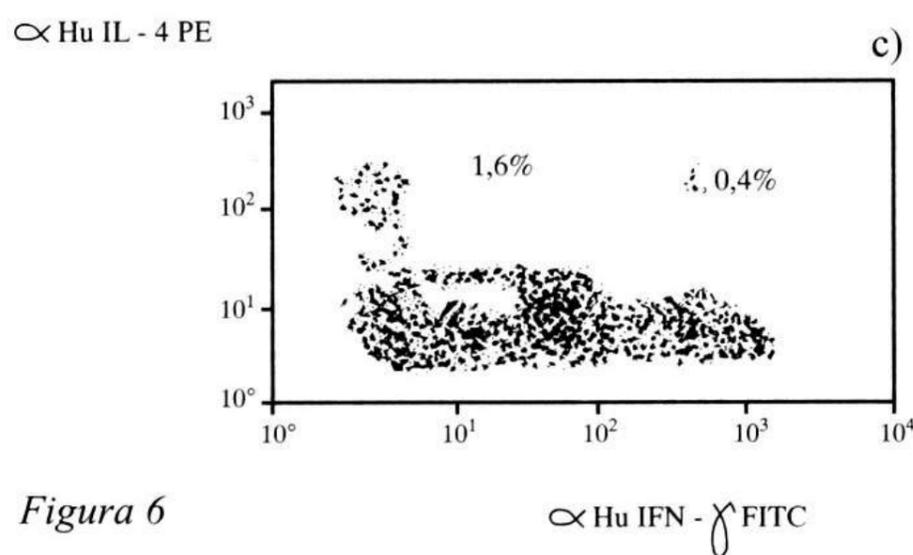


Figura 6

Actualmente en el Laboratorio de Inmunología del Hospital J.J. Aguirre, el uso del Citómetro de Flujo está orientado al estudio de subpoblaciones celulares en pacientes afectados por VIH/SIDA como también a otras inmunodeficiencias, y además en el estudio de Tipificación de Leucemias agudas, Leucemias crónicas y Linfomas.

## REFERENCIAS

1. *Flow Cytometry Manual, Becton Dickinson FacSCAN, 1994.*
2. *Stockbower J, Belgeri K, Bruck E. et al. Procedures for the collection of Diagnostic Blood specimens by venipuncture. 2nd Ed. Villanova: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984; 4: 117.*
3. *Jackson A, Warner N. Preparation, Staining, and analysis by Flow Cytometry of Peripheral blood leukocytes. Clinical Laboratory Immunology Manual. 1986: 226 - 35.*
4. *Calvelli T, Thomas ND, Paxton H, Gelman R, and Kaga Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping: A report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS (NIAID DAIDS) Cytometry 14: 702 - 714, 1993.*
5. *Nicholson J, Jones B. Immunophenotyping by Flow Cytometry: Its use in HIV infection. Lab Medica 1989; 6: 21 - 26.*
6. *Terstappen LWMN, Konemann M, Loken MR, et al. Flow Cytometric Characterization of LMA. Part I. Significance of Light Scattering properties. Leukemia 1991; 5: 315 - 21.*
7. *Duque PE, Everett ET, Ituraspe J, Flow Cytometric Analisis of Acute Leukemias. Clinical Immunology Newsletter, 1990; 10: 43 - 62.*
8. *Le Mestre A, Powers C, Reuben J, Monoclonal Antibodies and Flow Cytometric in Characterization of Acute Leukemias. Clin Lab Sci 1988; 1: 29 - 31.*
9. *Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of Acute Leukemias. Leukemia 1995; 9: 1783 - 6.*
10. *Bocking A, Giroud F, Reith A, Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. Anal Cell Pathol 1995; 8; 1: 67-74.*
11. *Dressler LG, Seamer LC. Controls, Standards and Histogram interpretation in DNA Flow Cytometry. Methods Cel Biol 1994; 41: 241 - 62.*
12. *Bacus JW, Bacus JV. Quality control in image cytometry: DNA ploidy. J Cell Biochem suppl 1994; 19: 153 - 64.*
13. *Corberaud JX, Reticulocyte analisis using Flow Cytometry. Hematol Cell Ther 1996; 38; 6: 487 - 94.*
14. *David BH, Bigelow NC, Flow Cytometric reticulocyte analisis and the reticulocyte maturity index. Ann NY Acad Sci 1993; 677: 281 - 92.*
15. *Bendre JG, To LB, Williams S et al: Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells J. Hematotherapy. 1992; 1: 329 - 41.*

- 
16. Brecher ME, Sims L, Schmitz J, et al: North American Multicenter study on Flow Cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells. *J Hematotherapy* 1996; 5: 227 - 36.
  17. Leijh PCJ, van Furth R and van Zwet TL, In vitro determination on phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. *Handbook of Experimental Immunology: Vol 2*. 1986.
  18. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by Flow Cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795 - 808.
  19. Li X, F Traganos, MR Melamed and Z. Darzynkiewicz. Single step procedure for labelling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY - conjugated deoxynucleotides. Detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry*, 1995; 20: 172 - 80.
  20. Li X, Darzynkiewicz Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif* 1995; 28: 572 - 79.
  21. Cleria M and Shearer G. The TH1 - TH2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunology Today* 1994; 15: 575 - 81.
  22. Lynne H Elson, Thomas B Nutman, Dean D Metsafe and Colman Prussin. Flow Cytometric Analysis for Cytokine Production identifies T helper 1, T helper 2 and T Helper 0. Cells within the Human CD4+ CD27- Lymphocyte subpopulation. *The Journal of Immunology*. 1995; 4294 - 4301.