

Citometría de flujo ¿qué nos aporta?



Irene Magdalena Rodríguez Gómez

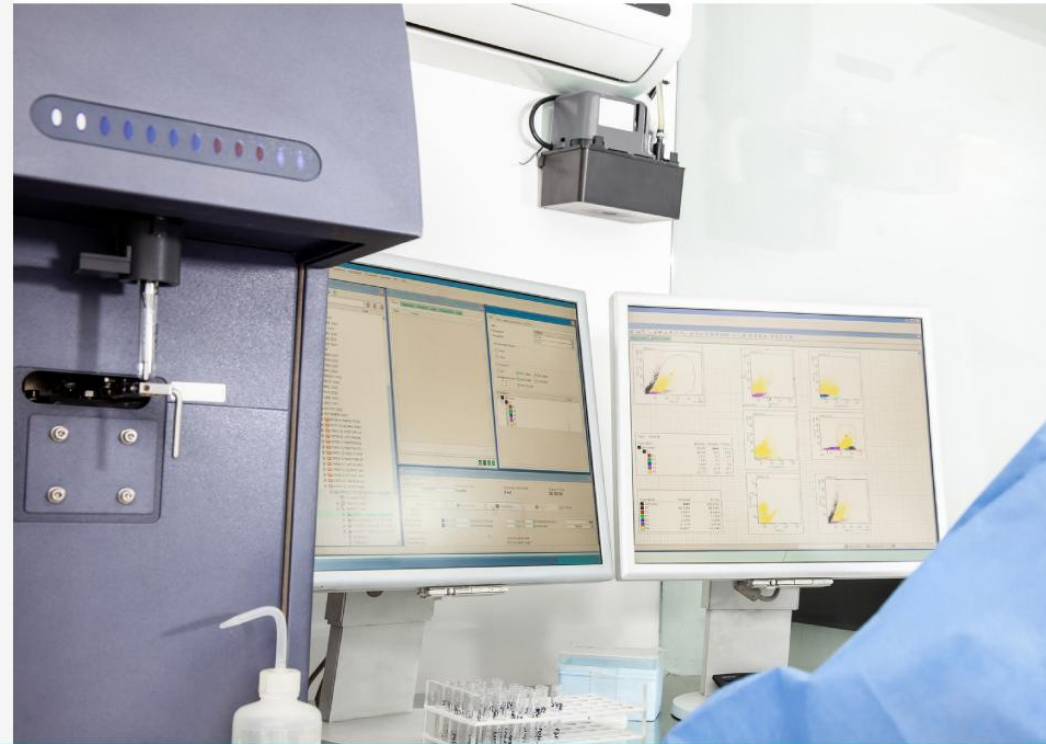
*Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología
Universidad de Córdoba*

La **citometría de flujo** es una herramienta que se desarrolló con la finalidad de **analizar la expresión de proteínas** y, consecuentemente, **fenotipar, células vivas**.

Como su nombre indica, está basada en la cuantificación de las células suspendidas en un fluido.

Para ello es imprescindible tener un buen conocimiento de:

- Instrumento con el que se trabaja, el citómetro
- Los anticuerpos
- Los fluorocromos disponibles en el mercado para la especie objeto de estudio



Atendiendo al funcionamiento del citómetro de flujo, este se fundamenta en el trabajo simultáneo de tres sistemas: **el sistema de fluidos, el sistema óptico y el sistema electrónico.**

SISTEMA DE FLUIDOS

Se encarga de **transportar las células marcadas con anticuerpos fluorescentes hasta el punto de interrogación para que puedan ser excitadas por los láseres.**

Esto se consigue mediante la focalización hidrodinámica creando un flujo laminar, que es cuando dos corrientes de fluido con diferentes velocidades de flujo corren una al lado de la otra en la misma dirección.

- ▶ En la **corriente central**, las células entran en el citómetro de flujo distribuidas aleatoriamente en el fluido de muestra (fluido 1).
- ▶ La corriente **de fluido de cubierta** (fluido 2), más lenta, corre paralela a la corriente de muestra, con ello se crea un flujo laminar que hace que las células pasen por delante del láser de una en una para lograr una resolución unicelular.

SISTEMA ÓPTICO

Tras el enfoque hidrodinámico, las células se mueven hacia el sistema óptico, el cual está compuesto, a su vez, por el **sistema óptico de excitación**, que consiste en rayos láser para dispersar la luz y excitar los anticuerpos marcados con fluorocromo en las células, y el **sistema óptico de recogida**, que consiste en filtros y espejos para dirigir la luz fluorescente dispersada y emitida a una serie de detectores o canales.

La luz que se dispersa frontalmente es recogida por el canal de dispersión frontal (FSC) y se utiliza como indicador del tamaño de la célula. La luz que se dispersa perpendicularmente al láser se detecta como dispersión lateral (SSC) y proporciona información sobre la granularidad y la complejidad celular. Las señales luminosas generadas por los fluorocromos atraviesan una serie de filtros, de “paso largo” o de “paso de banda” hasta que llegan al canal correspondiente.

SISTEMA ELECTRÓNICO

Convierte los espectros de emisión en **señales digitales** que se muestran de forma gráfica en diagramas de flujo para ser analizados por el ordenador mediante un software.

Los datos se ilustran mediante células individuales o puntos, y pueden mostrarse de diferentes formas, destacando los histogramas, que son gráficos de un parámetro que muestran la fluorescencia o expresión del parámetro de interés en el eje X y el número de células en el eje Y. Los gráficos de puntos donde la intensidad de fluorescencia o expresión de dos parámetros se muestra en los ejes X e Y.

Si el conocimiento del instrumento es fundamental, no lo es menos el trato de la muestra cuyas células van a ser analizadas. En ese sentido **es importante, mantener y controlar la temperatura, humedad, esterilidad y el tiempo de transporte**. A diferencia de lo que pudiera pensarse, **el citómetro permite analizar células procedentes de órganos**, la única salvedad es que estas células tienen que quedar finalmente en un medio en estado líquido.

Además, otras consideraciones notables serían, haber titulado todos los anticuerpos que se vayan a utilizar, incluir el empleo de colorantes de viabilidad, diseñar un buen panel de fluorocromos, minimizando la compensación entre los mismos e incluyendo los controles apropiados y, manteniendo siempre las condiciones entre réplicas.

Algunas de las aplicaciones más destacadas de la citometría de flujo consisten en la evaluación de:

1| Viabilidad celular: los colorantes de viabilidad reaccionan con las aminos libres tanto del interior de la célula como de su superficie.

En las células viables, el colorante se uniría únicamente en superficie ya que la membrana estaría íntegra, esto va a proporcionar una intensidad de fluorescencia baja. Sin embargo, en las células con membranas comprometidas, el colorante atravesaría la misma y por tanto se uniría tanto en la superficie como en el interior de la célula, determinando una intensidad de fluorescencia alta.

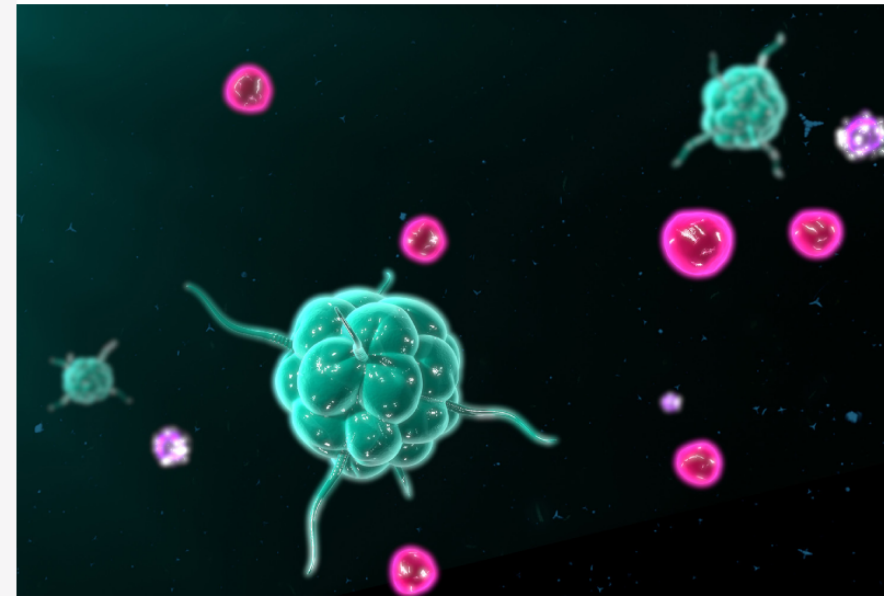
Con ello, en base a la expresión de fluorescencia se puede discernir entre células viables o no.



2| Detección de proteínas: mediante el empleo de anticuerpos conjugados con fluorocromos es posible determinar y cuantificar la expresión de proteínas localizadas en la superficie de la membrana celular, en el citoplasma (citoquinas, o moléculas de señalización, entre otras) e incluso en el interior del núcleo (factores de transcripción).



Para estos dos últimos casos es necesario fijar y permeabilizar la célula, siendo imprescindible **realizar diferentes pruebas de aproximación** para estimar qué método de fijación/permeabilización es el idóneo para el analito que se quiera determinar.



3| Detección de las fases de muerte celular:

Las técnicas que permiten identificar las fases de muerte celular se basan en la detección de la fosfatidilserina, un fosfolípido de la membrana celular que cuando la célula está entrando en apoptosis sufre una traslocación desde el interior al exterior de la membrana celular.

Existen diferentes proteínas como la anexina V y otras sondas sensibles que se unen a la fosfatidilserina. Por su parte, otros colorantes como el yoduro de propidio o DAPI tienen gran afinidad por el ADN, que en el caso de unión sería indicativo de que la membrana celular no está íntegra, señal de procesos de muerte celular más avanzados como necrosis o apoptosis tardía.



Por tanto, en base a la expresión de estos marcadores **se puede determinar si las células se encuentran en apoptosis temprana vs. apoptosis tardía/necrosis.**

4| Proliferación celular: los ensayos de proliferación están basados en el **uso de marcadores de proliferación que tienen la capacidad de unirse al ADN celular.**

En este sentido, una población recién marcada tendrá un 100% de su ADN teñido con este marcador, tras la división celular, una célula dará por mitosis dos células hijas, por tanto, la cantidad de marcador de proliferación se diluirá a la mitad, y así sucesivamente dependiendo del número de divisiones que tengan lugar.

Ello, permite la diferenciación de las generaciones de células hijas (menos intensidad de fluorescencia) de la primera generación de células (más intensidad de fluorescencia).





Si bien es cierto que, en el porcino, la citometría de flujo se emplea más a nivel de investigación que de diagnóstico, esta **es una herramienta que ofrece un amplio rango de posibilidades de detección de sustancias**, permitiendo fenotipar las células en base a su expresión y clasificarlas, pudiendo caracterizarlas e incluso aislarlas para realizar estudios posteriores más específicos.



¡Muchas gracias!



Grupo de Comunicación Agrinews S.L.

*Avinguda de Jaume Recoder, 17, 08301 Mataró,
Barcelona (España)*

info@grupoagrinews.com

Tel: +34 93 115 44 15