

Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**Volumen
Volume** **17**

**Número
Number** **1**

**Enero-Marzo
January-March** **2004**

Artículo:

Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

***Others sections in
this web site:***

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica

LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ*

MA. ELISA DRAGO SERRANO†

JULIA PÉREZ RAMOS‡

ANA CECILIA ZAMORA§,II

FABIOLA GÓMEZ ARROYO¶

TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES‡

FELIPE MENDOZA PÉREZ*,‡

* Departamento de Biología Molecular. INER.

† Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Xochimilco.

§ Hospital Universitario "Dr. José E. González". Monterrey, Nuevo León.

¶ Servicio Clínico 1, INER.

II Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Veterinaria, UNAM.

Trabajo recibido: 17-II-2004; Aceptado: 26-III-2004

RESUMEN

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función

Palabras clave: Citometría de flujo, inmunofenotipificación, lavado bronquioalveolar, enfermedades pulmonares, VIH.
Key words: Flow cytometry, immunophenotyping, bronchoalveolar lavage, lung diseases, HIV.

que pueda ser marcada con un fluorocromo. Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínicas, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. Esta técnica es empleada también en el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como la caracterización de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos, entre otros padecimientos. En los últimos 20 años, el análisis de enfermedades pulmonares de origen inmunológico por citometría de flujo ha jugado un papel importante en el entendimiento y diagnós-

ABSTRACT

Flow cytometry is an analytical method that allows the rapid measurement of certain physical and chemical characteristics of cells or particles suspended in liquid and produce signals when they pass individually through a beam of light. An important analytical feature of flow cytometers is their ability to measure multiple cellular parameters such as cell size, shape and internal complexity and, of course any cell component or function that can be detected by a fluorescent dye. The most prominent uses of flow cytometry in medical practice are in the related fields of laboratory hematology and clinical immunology, for a variety of tasks involving blood cell counting and classification. This technique is also used for counting lymphocyte subpopulations in patients with HIV, characterization of acute leukemias and chronic lymphomas between other diseases. Over the last 20 years, analysis of immunological lung diseases by flow cytometry has played a major role in the understanding and as tool of diagnosis, such as sarcoidosis, eosinophilic pneumonia or hypersensitivity pneumonitis. So the applications of flow cytometry are numerous, and this has lead to the widespread use of this instruments in biological research and medical fields. Over-

tico de enfermedades como sarcoidosis, neumonía eosinofílica o neumonitis por hipersensibilidad. Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas, lo cual ha permitido el empleo de estos instrumentos de manera amplia en los campos, tanto de la investigación biológica como médica. Esta revisión brinda un panorama general de los principios básicos de la citometría de flujo y la muestra como una herramienta reproducible y aplicable a una gran variedad de campos médicos, así como su empleo en el campo de las enfermedades pulmonares.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas, en gran medida, a los avances producidos por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. De entre ellos destaca la citometría de flujo, que ha alcanzado gran relevancia, además de la que ya tenía en la investigación básica.

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho que en la última década su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos¹.

La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular². La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible los estudios de la densidad y la distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular, permitiendo identificar subpoblaciones celulares³.

Por otra parte, en comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la citometría de flujo es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

all this review shows a brief overview of basic principles of and shows this as a reproducible tool applicable to a wide range of medical approaches as well as its use in lung diseases field.

43

¿QUÉ ES LA CITOMETRÍA DE FLUJO?

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Figura 1)⁴.

CONCEPTOS SOBRE INMUNOFLUORESCENCIA

El término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. Ya en 1941, Coons⁵ informó de la aplicación de esta técnica para localizar antígenos y anticuerpos en secciones de tejido. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein en 1975⁶, incrementó dramáticamente el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular.

La fluorescencia ha sido usada para visualizar ciertas moléculas y estructuras por medio de la microscopía óptica durante muchos años. Esta ha encontrado una extensa área de aplicación en la citometría de flujo. La capacidad para detectar

simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre completamente el campo del análisis multiparamétrico.

Cuando una molécula absorbe luz, y por tanto energía, algunos de sus electrones pueden alcanzar una órbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado un estado de excitación, y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a su órbita de menor energía. En algunos compuestos el electrón excitado cae rápidamente, usualmente en nanosegundos, al estado basal, emitiendo un cuantos de luz o fotón y desprendiendo energía. Esta transición radiante se denomina *fluorescencia*⁷. A este tipo de compuestos se les denomina fluorescentes o *fluorocromos*.

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula a un grupo específico de células que comparten propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés. Por ejemplo, para el análisis de subpoblaciones linfocitarias se requiere seleccionar un área de trabajo distinguiendo los leucocitos por sus propiedades de dispersión de luz (tamaño contra complejidad celular). Una vez que las células de interés han sido distinguidas de los otros tipos celulares, se puede usar la inmunofluorescencia para

determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador, por ejemplo, del marcador CD4 para monitorear el progreso de la enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁸, entre muchas otras aplicaciones clínicas.

PARÁMETROS QUE SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula. Éstos se dividen en (Figura 2):

- Parámetros nucleares
- Parámetros citoplasmáticos
- Parámetros de superficie
- Parámetros extracelulares

En la Tabla I se resumen los parámetros que pueden ser medidos por medio de esta técnica. Un aspecto importante y que representa una ventaja de ella, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos. Así, es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie (Figura 3) y, al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la célula como su patrón de

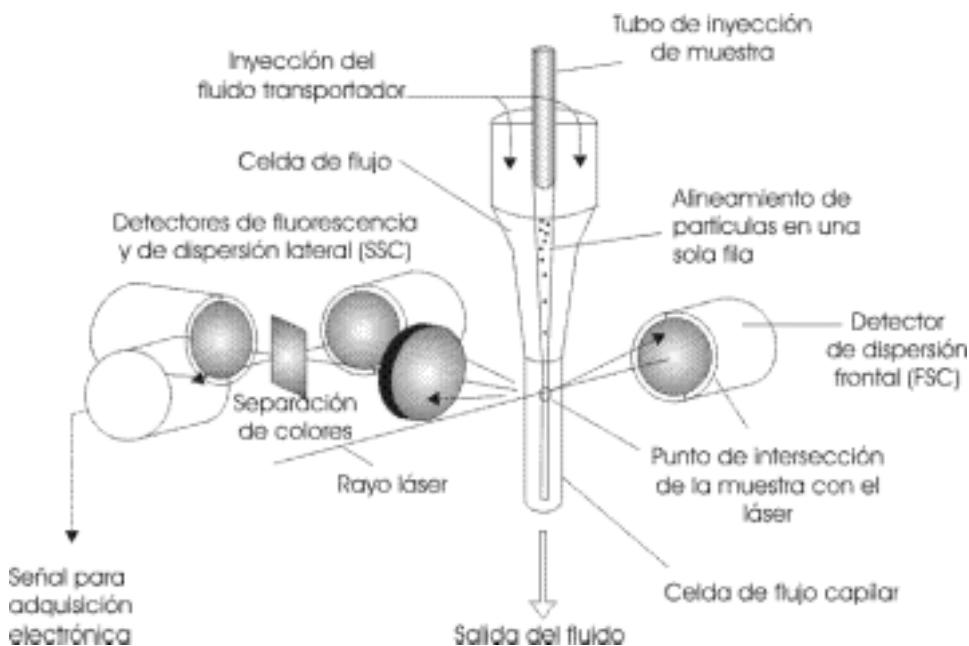


Figura 1. Principio general de la citometría de flujo.

secreción de citocinas, o bien, la etapa del ciclo celular en la que se encuentra.

APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Inmunofenotipificación

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación de este método analítico en el

diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedad mínima residual. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra y, más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual). La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contri-

Tabla I. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo.

Parámetros nucleares	Parámetros basados en ADN	<ul style="list-style-type: none"> -Contenido de ADN -Contenido de pares GC/AT -Superenrollamiento de ADN -Estructura de la cromatina -Roturas de hebras de ADN 	<ul style="list-style-type: none"> -Ploidía de ADN -Ciclo celular -Apoptosis-necrosis -Cariotipo en flujo
	ADN + otros parámetros	<ul style="list-style-type: none"> -ADN/ARN -ADN/proteínas totales -ADN/antígenos nucleares -ADN/antígenos celulares 	<ul style="list-style-type: none"> -Regulación ciclo celular -Ciclo celular de poblaciones específicas
	Parámetros no basados en ADN	<ul style="list-style-type: none"> -Receptores nucleares -Expresión de genes indicadores ("reporteros") -Morfología nuclear -Componentes nucleares 	
Parámetros de superficie	Estructuras de la superficie celular	<ul style="list-style-type: none"> -Receptores de superficie -Sitos de unión a lectinas -Densidad de superficie -Pared celular 	
	Dinámica de la superficie celular	<ul style="list-style-type: none"> -Unión de ligandos -Transporte/internalización de ligandos -Eflujo de solutos -Exposición de receptores -Potencial de membrana 	
Parámetros citoplasmáticos	Componentes intracelulares	<ul style="list-style-type: none"> -Proteínas totales -Proteínas estructurales -Proteínas funcionales -Glicoproteínas intracelulares -Lípidos intracelulares -Tioles libres 	
	Funciones intracelulares	<ul style="list-style-type: none"> -Actividad enzimática -Síntesis de proteínas -Potenciales de membrana 	
	Entorno intracelular	<ul style="list-style-type: none"> -Concentración de iones -Movimiento de iones -Lípidos y proteínas oxidados 	
Parámetros extracelulares	Dinámica de la secreción celular	<ul style="list-style-type: none"> -Captura de proteínas secretadas -Ensayos de cuantificación en suero 	<ul style="list-style-type: none"> -Activación celular -Diferenciación celular

45

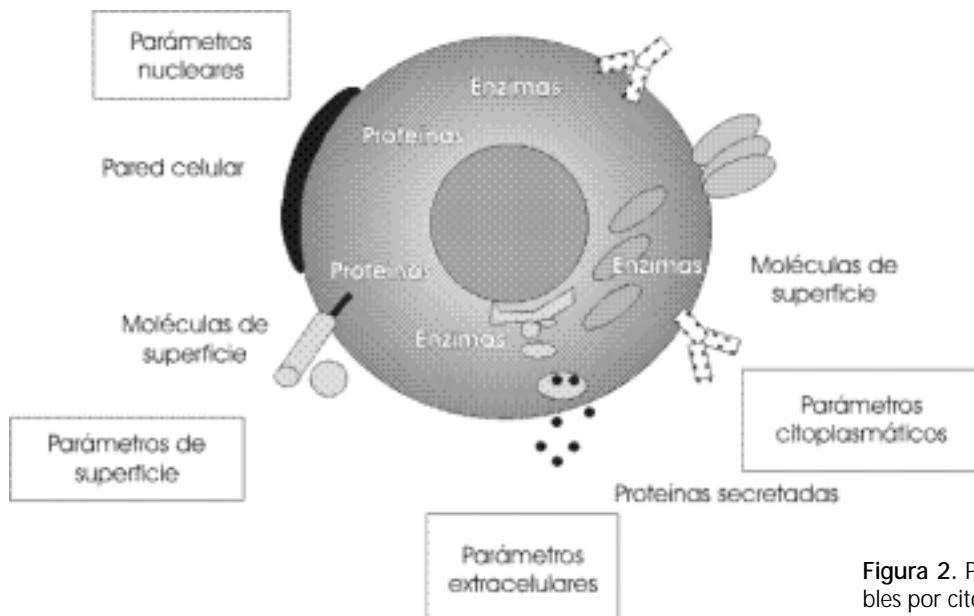


Figura 2. Parámetros medibles por citometría de flujo

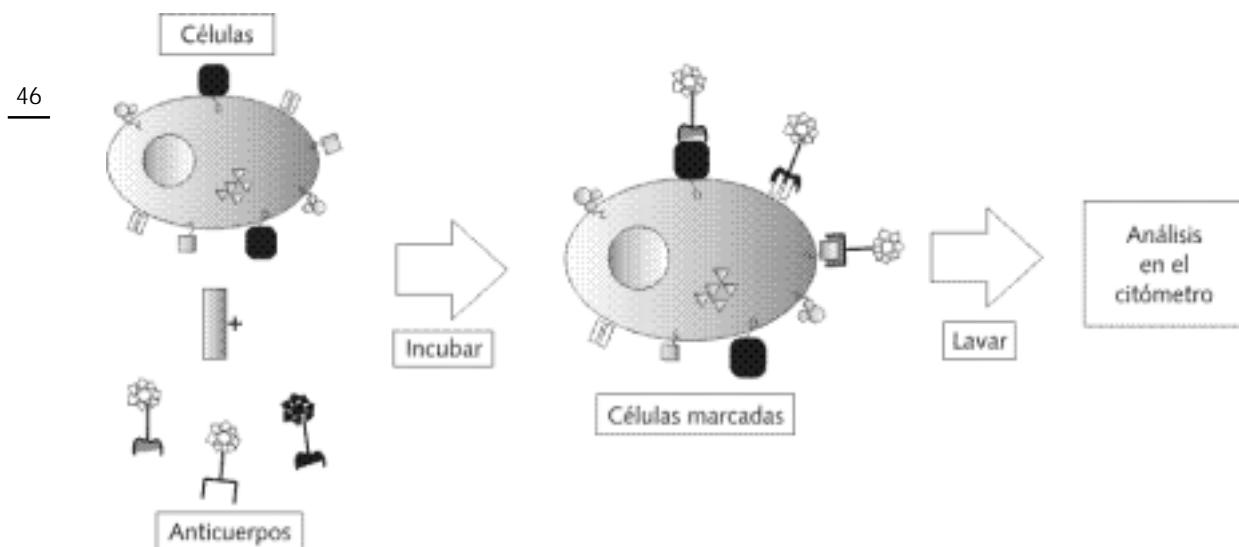


Figura 3. Procedimiento regular de marcaje o tinción fenotípica para células humanas.

buye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba. En otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple⁹, el lupus eritematoso sistémico¹⁰ y la artritis reumatoide¹¹, la citometría de flujo ha demostrado su utilidad. También se ha demostrado útil en el

seguimiento de la recuperación inmune tras el trasplante de médula ósea¹², en la identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico¹³, o en el monitoreo terapéutico de los enfermos con anemia aplásica¹⁴. En la Tabla II se condensan algunas de las aplicaciones clínicas más importantes y con mayor empleo en la actualidad.

Tabla II. Aplicaciones clínicas generales de la citometría de flujo.

Aplicaciones generales	Aplicaciones por área	Parámetros sujetos de análisis
Diagnóstico basado en el análisis celular	Caracterización de células normales Identificación y detección de células anormales	<i>Parámetros estructurales</i> Tamaño Complejidad <i>Antígenos de superficie</i> Identidad Linaje Función Activación <i>ADN, ARN y parámetros relacionados</i> Ploidía Estado proliferativo Estadio de maduración Expresión génica <i>Bioquímica intracelular</i> Condiciones basales Respuesta bioquímica a estímulos controlados <i>Alteraciones en la morfología celular</i> Cambios en tamaño Cambios en granularidad <i>Alteraciones en el inmunofenotipo</i> Inmunoproliferación/inmunodeficiencia <i>Alteraciones en el genotipo</i> Cambios en el contenido de ADN (ploidía) Cambios en la expresión de genes <i>Alteraciones en la bioquímica intracelular</i> Cambios en la síntesis y concentración de moléculas Cambios en la actividad de enzimas y en el flujo a través de rutas Alteraciones en el número y la función de orgánulos subcelulares Cambios en la respuesta bioquímica a estímulos controlados <i>Detección de células de baja frecuencia</i> Detección de células tumorales circulantes Detección de células fetales en sangre materna Detección de células activadas o antígeno-específicas circulantes
Aplicaciones pronósticas	Correlación de parámetros citométricos con otros parámetros clínicos bien establecidos Parámetros implicados directamente en el proceso patológico Parámetros implicados indirectamente en el proceso patológico	Estudios retrospectivos con material de archivo Estudios prospectivos Análisis de muestras específicas de la patología Análisis de parámetros específicos de la patología Análisis de muestras indicadoras Análisis de parámetros indicadores de la patología Análisis de parámetros predictivos de riesgo
Evaluación y monitorización del tratamiento	Selección de células en la terapia celular Análisis de la acción terapéutica a nivel celular	Análisis de progenitores en el trasplante autólogo Pruebas cruzadas de trasplantes heterólogos Detección y cuantificación de leucocitos residuales en hemopreparados Cambios en parámetros estructurales Cambios en parámetros funcionales

	Análisis de la acción terapéutica a nivel de paciente	Detección de recidivas y enfermedad mínima residual Establecimiento de patrones pronósticos de éxito terapéutico
	Detección y análisis de resistencia a la terapia	Análisis de la capacitación y retención de fármacos Análisis del metabolismo de fármacos
Análisis de la lesión y muerte celular	Detección de células de lesión celular subletal Cuantificación de la viabilidad celular	Cambios en parámetros estructurales Cambios en parámetros funcionales Determinación de efectos citotóxicos globales Control de calidad de las preparaciones celulares
	Caracterización de los mecanismos de muerte celular	Identificación y análisis de células apoptóticas Identificación de células necróticas
Aplicaciones en inmunohematología	Análisis de antígenos Análisis de anticuerpos Análisis de función celular	Inmunofenotipo de superficie Detección de antígenos intracelulares Detección de antígenos circulantes Detección de anticuerpos circulantes Detección de anticuerpos unidos a células Análisis de proliferación celular Análisis de bioquímica intracelular Análisis del índice de muerte celular

48

APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO A LA INVESTIGACIÓN BÁSICA

Son innumerables las aplicaciones de la citometría de flujo a la investigación básica, desde campos como la microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular, entre otros. Sin embargo, es posible intentar clasificar dichas aplicaciones según el área específica en la que es posible utilizar la citometría de flujo como herramienta de investigación (Tabla III). La citometría de flujo ha sido utilizada en el monitoreo del contenido de ADN¹⁵, expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio¹⁶, proliferación y apoptosis¹⁷. Virtualmente es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo, esto hace posible que las aplicaciones del citómetro de flujo se adapten prácticamente a cualquier necesidad de investigación. Actualmente, la relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más estrecha dando la oportunidad a su vez a la aplicación diagnóstica, pronóstica y de tratamiento en múltiples enfermedades.

CITOMETRÍA DE FLUJO Y LA INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES PULMONARES

En los últimos 20 años, la citometría de flujo ha jugado un papel primordial en el avance del entendimiento y habilidad para diagnosticar una variedad de desórdenes linfoproliferativos¹⁸. Una de las aplicaciones nuevas más interesantes es en la evaluación de pacientes con enfermedades inmunológicas del pulmón¹⁹. Una muestra típica es aquella que es recolectada a partir de lavados bronquioalveolares (LBA), cuya utilidad diagnóstica ha quedado ampliamente demostrada²⁰⁻²⁵. Cuando el lavado es realizado en pulmones normales, la célula presente más predominante es el macrófago, el cual está en un porcentaje de aproximadamente 90% o más de celularidad. Los linfocitos usualmente representan menos del 10% de la población celular, los granulocitos representan la población celular minoritaria con el 1-2%²⁶. En fumadores, el porcentaje de linfocitos es aún menor²⁷. En muchos pacientes con enfermedades pulmonares inmunitarias, el LBA puede estar acompañado por un incremento en linfocitos o eosinófilos. Cuan-

Tabla III. Aplicaciones generales de la citometría de flujo a la investigación básica.

Aplicación general	Parámetros sujetos de análisis	Información que proporciona
Inmunofenotipificación de superficie	Identificación de subpoblaciones celulares mediante anticuerpos monoclonales	Linaje celular Estadio de maduración hematopoyética Implicación en la respuesta inmune Grado de activación celular
	Identificación de subpoblaciones celulares en la hematopoyesis	Diagnóstico y clasificación de enfermedades hematológicas Leucemias agudas y crónicas Linfomas Inmunodeficiencias Hemoglobinuria paroxística nocturna Detección de enfermedad mínima residual Enumeración de precursores hematopoyéticos CD34+ Diagnóstico de enfermedades congénitas plaquetarias Tromboastenia de Glanzmann Síndrome de Bernard-Soulier
Antígenos intracelulares	Detección de proteínas intracelulares con anticuerpos fluorescentes	Producción de citocinas intracelulares
	Fenotipo intracelular de leucemias y linfomas	Detección de células tumorales circulantes
	Expresión de reguladores del ciclo celular: ciclina D1	Cadenas ligeras de Ig intracelulares: κ y λ Antígenos de superficie que todavía no se expresan en superficie: CD3, CD22
	Expresión de proteínas antiapoptóticas: BCL-2, Rb	Enzimas intracelulares
	Expresión de proteínas supresoras de tumores: p53	
Antígenos circulantes	Análisis de citocinas intracelulares	Fenotipo Th0, Th1 y Th2
	Detección de autoanticuerpos circulantes	Anticuerpos antiplaquetarios Anticuerpos antineutrófilos
	Detección de aloanticuerpos circulantes	Pruebas cruzadas pretrasplantes Uso de esferas recubiertas con HLA específicos
Inmunoproliferación	Detección de anticuerpos unidos a células de la sangre	
	Análisis monoparamétrico del ciclo celular	Contenido de ADN
	Análisis multiparamétrico del ciclo celular	Fenotipo de superficie y contenido de ADN
	Análisis de la historia de división celular	Contenido de ADN y antígenos relacionados con el ciclo Trazadores celulares y fenotipo de superficie

Bioquímica intracelular	Funciones bioquímicas de la inmunidad específica	Síntesis y secreción de citocinas Expresión de moléculas de adhesión Movimientos iónicos tras la activación celular
	Funciones bioquímicas de la inmunidad innata	Fagocitosis y destrucción de microorganismos Generación intracelular de especies reactivas de oxígeno Actividad proteolítica intracelular Respuestas quimiotácticas Expresión de moléculas de adhesión Explosión oxidativa
	Funciones bioquímicas de las plaquetas	Activación y agregación plaquetarias
Muerte celular en el sistema inmune	Análisis de células efectoras citolíticas	Identificación fenotípica de subpoblaciones CD8 y NK
	Análisis de la citotoxicidad mediada por células	Interacción entre células blanco y efectoras
	Análisis de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos	Monitorización de la terapia con anticuerpos monoclonales
	Análisis del proceso y mecanismo de muerte celular	Identificación y cuantificación de células apoptóticas Identificación y cuantificación de células necróticas Análisis de parámetros celulares durante la apoptosis
Análisis funcional	Análisis cinético <i>in situ</i>	Detección de efectos tempranos o transitorios
	Análisis secuencial	Evaluación de procesos dinámicos

do las células que están incrementadas son los linfocitos, resulta importante saber qué subpoblación se encuentra elevada. La citometría de flujo es ideal para esta evaluación. La proporción relativa de linfocitos, macrófagos y granulocitos se determina fácilmente a partir de gráficas de tamaño (*Forward scatter FSC*) contra complejidad celular (*Side scatter SSC*). Los estudios de fluorescencia empleando diferentes fluorocromos permiten determinar fácilmente la composición de subconjuntos de linfocitos (CD4⁺ y CD8⁺). De esta manera, es posible ensayar hasta siete colores, con citómetros modernos, que representan siete marcadores diferentes sobre

poblaciones celulares, requiriéndose sólo una pequeña cantidad de muestra (250,000 células en 50 µL) a partir de un LBA.

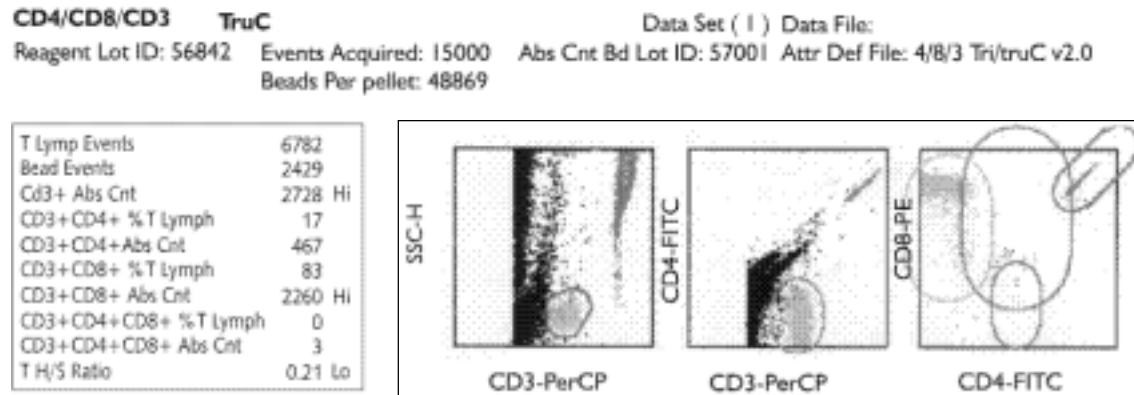
Por ejemplo, un incremento en el número de células inflamatorias en un LBA sugiere una alveolitis²⁸. El tipo de células en el lavado puede correlacionar con el tipo de inflamación visto en las paredes alveolares de la biopsia. Aunque esas correlaciones no son diagnósticas, pueden ayudar en el diagnóstico cuando son combinadas con otros datos.

En otro ejemplo, un número elevado de eosinófilos sugiere una neumonía eosinofílica²⁹, asma^{30,31}, toxicidad por drogas o aspergilosis

broncopulmonar alérgica. Los números más altos de cuentas de eosinófilos son vistas en una neumonía eosinofílica. Esos pacientes tienen típicamente también un incremento moderado de linfocitos con células plasmáticas ocasionales. El cuadro típico del lavado insertado en el contexto clínico adecuado es altamente sugerente de neumonía eosinofílica y podría evitar que al paciente se le practicara una biopsia a cielo abierto. La linfocitosis en un LBA se puede asociar con varias enfermedades pulmonares inflamatorias. La distribución relativa de subpoblaciones de células T puede suministrar información adicional útil. Un número elevado de linfocitos T CD4⁺ da como resultado que la relación CD4/CD8 sea mayor que uno, y esto es visto en pacientes con

sarcoidosis³² y otras enfermedades que producen granulomas, entre las que se encuentran la tuberculosis³³, asbestosis³⁴ y artritis reumatoide³⁵. En general, una enfermedad pulmonar activa está asociada con una relación CD4/CD8 elevada. Aproximadamente un 90% de los pacientes con sarcoidosis tienen una alveolitis linfocitaria. En el caso de la sarcoidosis, aproximadamente el 60% de los pacientes tienen una relación CD4/CD8 mayor de 3.5. Para relaciones CD4/CD8 mayores de 5 y cercanas a 10 la especificidad de un diagnóstico de sarcoidosis es mayor³⁶. Es característico de la alveolitis alérgica extrínseca un incremento importante en la proporción de linfocitos, siendo ésta de al menos el 50% del total de las células presentes en el LBA^{37,38}. En al-

(A)



51

(B)

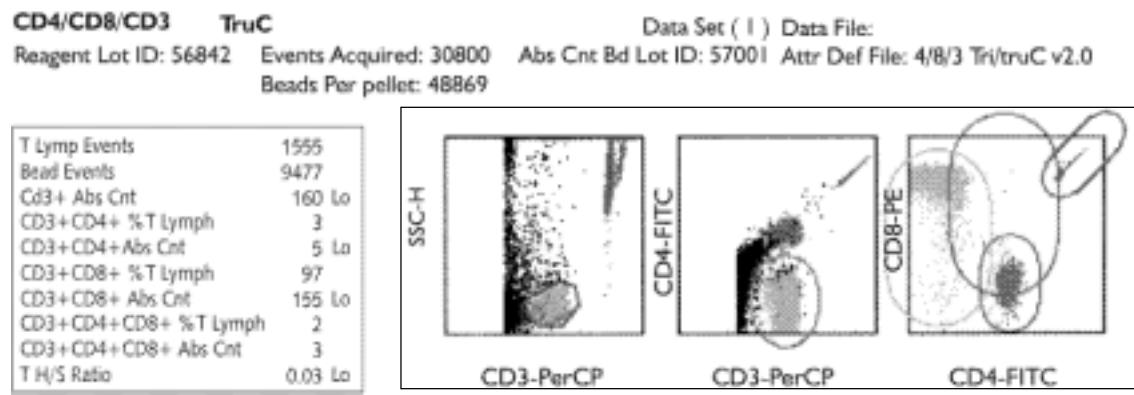


Figura 4. Estudio de conteo total de linfocitos T CD4/CD8 en un paciente con VIH en estado temprano de la infección (A) con una cuenta de linfocitos T CD4⁺ de 17% y en estado tardío, (B) con una cuenta de linfocitos T CD4⁺ de 3%. Estudio de rutina realizado en el laboratorio de VIH del INER.

gunos casos los neutrófilos y eosinófilos pueden verse incrementados. Dicha linfocitosis es predominantemente CD8 (+) dando como resultado una disminución de la relación CD4/CD8³⁹. Los trabajos publicados al respecto son contradictorios⁴⁰⁻⁴³ y en nuestro laboratorio hemos observado que pacientes alveolíticos a diferentes etapas de la enfermedad (subagudos y crónicos), muestran diferentes relaciones de CD4/CD8 (datos no publicados). Las células NK pueden también estar presentes y se observa asimismo evidencia clara de activación de células T por medio de marcadores como CD69 y HLA-DR⁴⁴⁻⁴⁶. En este mismo sentido, cabe aclarar que la evaluación de las muestras de LBA de los diferentes tipos de alveolitis no permite distinguir entre los diferentes cuadros clínicos, pero puede ayudar a excluir otros. Las aplicaciones en el área de las enfermedades pulmonares de origen inmunológico se extienden aún más, se ha estudiado con el auxilio de la citometría de flujo el papel que juegan ciertas citocinas en enfermedades como neumonitis por hipersensibilidad⁴⁷. O la expresión de ciertos receptores de quimiocinas y sus ligandos asociados con algunos padecimientos como rechazo a trasplantes pulmonares⁴⁸, asma⁴⁹, alveolitis⁵⁰ o sarcoidosis⁵¹, así como la incidencia y función de las células NK^{52,53} en estas mismas enfermedades intersticiales. Asimismo, la prevalencia de las subpoblaciones de linfocitos T gamma-delta ha mostrado ser importante para algunas enfermedades como la sarcoidosis⁵⁴, neumonitis por hipersensibilidad⁵⁵ o fibrosis pulmonar idiopática⁵⁶.

Actualmente, están en proceso protocolos de investigación en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) que contemplan la determinación de un amplio perfil fenotípico que proporciona información fundamental sobre el estado celular de la neumonitis por hipersensibilidad inducida por antígeno aviario, la de mayor incidencia en México, en sus diversas etapas clínicas, así como en la fibrosis pulmonar idiopática. Mediante esta técnica hemos realizado también mediciones de carácter funcional sobre la actividad celular, como detección intracelular y secreción de citocinas (datos no publicados). La caracterización de estas enfermedades intersticiales en México, permitirá visualizar los mecanismos inmunes que se establecen y que como

consecuencia determinan los distintos estados de dichas enfermedades pulmonares.

CITOMETRÍA DE FLUJO Y VIH

El monitoreo de subpoblaciones linfocitarias en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fundamentalmente la cuantificación en sangre periférica de las células CD4+ y los linfocitos CD8+ aporta un valor diagnóstico y pronóstico en esta patología⁵⁷. En la actualidad, representa una técnica de rutina en muchos laboratorios, ante la necesidad de establecer controles periódicos del número de células CD4+ en estos pacientes⁵⁸. El antígeno CD4 es el receptor para el VIH. Cuando éste infecta humanos, las células que con más frecuencia infecta son las CD4+, que se multiplican para combatir infecciones y producir más copias del VIH. El número absoluto de linfocitos T CD4+ es el parámetro celular asociado más estrechamente a la progresión de la enfermedad causada por el VIH y al pronóstico del paciente⁵⁹. La relación entre los linfocitos T CD4+ y CD8+ (CD4/CD8), se conoce como la relación cooperador/supresor. En personas sanas esta relación se encuentra entre 0.9 y 1.9, lo que significa que hay una a dos células CD4 por cada célula CD8⁶⁰. A partir de 1992, en los países desarrollados, se ha establecido una serie de lineamientos para la realización correcta del conteo de células CD4/CD8. Se propone el uso de citometría de flujo y un panel de 12 anticuerpos monoclonales combinados: CD45/CD14 (para enmarcar una ventana); CD3/CD4 (para medir linfocitos T cooperadores); CD3/CD8 (para medir linfocitos T supresores); CD3/CD19 (para separar la población de linfocitos T y B); CD3/CD56 (para separar las células NK); y, el control de anticuerpos de isotipo. Asimismo, en México se han publicado trabajos donde se sugiere la conveniencia de utilizar un panel semejante para el conteo de células CD4+, considerando un mínimo de seis anticuerpos⁶¹. En el INER, el SIDA es la principal causa de mortalidad hospitalaria en personas de 18 a 45 años de edad y ocupa, desde hace varios años, una de las cinco primeras causas de mortalidad general de los pacientes hospitalizados. Desde hace cinco años la citometría de flujo se utiliza en el INER para realizar el conteo de

linfocitos T, tanto en los pacientes internados en el hospital como a los que se presta este servicio de manera extrahospitalaria como seguimiento de la enfermedad (Figura 4). Se atienden un promedio de 300 pacientes mensuales, lo cual muestra la importancia clínica, tanto diagnóstica como pronóstica que la citometría de flujo tiene en este renglón dentro del INER.

LA CITOMETRÍA DE FLUJO A LA VANGUARDIA EN EL INER: FACSARia

Actualmente se cuenta ya con el citómetro de flujo que ha revolucionado la era moderna de la citometría, el FACSARia de Beckton Dickinson. Gracias a la fundación Gonzalo Río Arronte, IAP, el INER adquirió el primer FACSARia que llega a nuestro país y, el primero también en América Latina y que se pone al servicio del Instituto en el área de investigación básica. Se trata de un separador celular de alta velocidad y desempeño, capaz de medir hasta 11 parámetros de manera simultánea. Este instrumento cuenta con alineación automática de láser y una nueva plataforma de análisis en sistema Windows. Cuenta con un sistema de limpieza automática entre muestras, así como limpieza general del instrumento. Gracias a su sistema totalmente digital es capaz de adquirir 70,000 eventos (células o partículas) por segundo y es posible separar 25,000 células con una pureza al menos del 98%.

Las aplicaciones en investigación básica del FACSARia son innumerables, van desde la caracterización fenotípica de siete colores, hasta análisis de parámetros intracelulares, análisis de cromosomas, organelos celulares, apoptosis, estudios funcionales, así como separación celular altamente específica con fines de clonación. Así, el INER se encuentra ya a la vanguardia en citometría de flujo a nivel mundial y con la capacidad científica para desarrollar investigación básica en enfermedades pulmonares con calidad internacional.

Agradecimientos

A la química Edna Hannia Rodríguez Aguirre por facilitarnos la imagen característica de un paciente con VIH en estado avanzado y tardío tratado en el INER.

REFERENCIAS

1. Orfao A, Ciudad J, López A, López-Berges MC, Vidielles B, Macedo A, et al. *La citometría de flujo en el diagnóstico clínico*. Servicio General de Citometría. Universidad de Salamanca, 1993.
2. Orfao A, González M, Ciudad J, López-Berges MC, López A, San Miguel JF, et al. *Aplicaciones de la citometría de flujo en el diagnóstico hematológico*. Biol Clin Hematol 1992;13:456-523.
3. Goding JS. *Conjugation of Antinodies with Fluorochromes Modifications to the Standard Methods*. J Immunol Meths 1976;13:215-223.
4. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken, 2003.
5. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. *Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group*. Proc Soc Exptl Biol Med 1941;47:200-204.
6. Kohler G, Milstein C. *Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity*. Nature 1975;356:495.
7. Longobardi GA. *Flow Cytometry. First Principles*. New York: Wiley-Liss, 1992.
8. Barry SM, Anossy G. *Optimal Gating Strategies for Determining Bronchoalveolar Lavage CD4/CD8 Lymphocyte Ratios by Flow Cytometry*. J Immunol Methods 2004;285:15-23.
9. Matsui M, Araya SI, Wang HY, Matsushima K, Saida T. *Immunomonitoring Measures in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis*. J Neuroimmunol 2004;148:192-199.
10. Dai SM, Matsuno H, Nakamura H, Nishioka K, Yudoh K. *Interleukin-18 Enhances Monocyte Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1Beta Production Induced by Direct Contact with T Lymphocytes: Implications in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheum 2004;50:432-443.
11. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. *Decreased CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus*. Scand J Immunol 2004;59:198-202.
12. Kalwak K, Turkiewicz D, Ussowicz M, Gorczynska E, Toporski J, Ryczan R, et al. *Clinical Value of the Flow Cytometric Method for Measuring Lymphocyte Subset Activation: Spontaneous Activation of T-cell Subpopulations is Associated with Acute GvHD*. Transplant Proc 2003;35:1559-1562.
13. Cotteret S, Belloc F, Boiron JM, Bilhou-Nabera C, Dumain P, Boyer C, et al. *Fluorescent in situ Hybridization on Flow-sorted Cells as a Tool for Evaluating Minimal Residual Disease or Chimerism after Allogeneic bone Marrow Transplantation*. Cytometry 1998;34:216-222.
14. Ruiz-Arguelles GJ, Ramirez Cisneros FJ, Ruiz-Arguelles A, Perez-Romano B, Morales-Aceves R. *Glycosylphosphatidylinositol-anchored Cell Surface Protein Deficiency in Mexican Mestizo Patients with Aplastic Anemia*. Rev Invest Clin 1999;51:5-9.
15. Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G. *Fluorescent Spectra of DNA Dyes Measured in a Flow Cytometry*. Cytometry 1996;24:234-242.
16. Krishan A. *Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Ropidium Lodide Staining*. J Cell Biol 1975;66:188-194.

17. McCloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M, Pahwa S. Use of a Flow Cytometric Assay to Quantitate Apoptosis in Human Lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:14-18.
18. Orfao AC, González JM, San Miguel JF, López-Berges MC, García AR, Ramos F, et al. Prognostic Value of S-phase WBC Count in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* 1992;6:47-51.
19. Rotaeche A, Costabel D. Bronchoalveolar Lavage in Diagnostic Cytology. Compendium on Diagnostic Cytology. 8th ed. Chicago IL: Tutorials of Cytology, 1997.
20. Wallaert B. Value of Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis and Management of Diffuse Interstitial Fibrosing Lung Diseases. *Rev Prat* 1991;41:1267-1270.
21. Walters EH, Ward C, Li X. Bronchoalveolar Lavage in Asthma Research. *Respirology* 1996;1:233-245.
22. Gruchaa J, Górska P. Use of Bronchoalveolar Lavage for Diagnosis of Respiratory Diseases. *Med Pr* 1995;46:173-178.
23. Luisetti M, Meloni F, Ballabio P, Leo G. Role of Bronchial and Bronchoalveolar Lavage in Chronic Obstructive Lung Diseases. *Monaldi Arch Chest Dis* 1993;48:54-57.
24. Strauz J. Bronchoalveolar Lavage: Clinical Routine Examination or Research Method? *Orv Hetil* 1992;133:471-2,477-8.
25. Drent M, Costabel U. Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of Diffuse Interstitial Lung Disease. *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:2661-2665.
26. Wahlström J, Berlin M, Sköld CM, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J. Phenotypic Analysis of Lymphocytes and Monocytes/macrophages in Peripheral Blood and Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *Thorax* 1999;54:339-346.
27. Hoser G, Kawiak J, Domagala-Kulawik J, Kopinski P, Droszcz W. Flow Cytometric Evaluation of Lymphocyte Subpopulations in BALF of Healthy Smokers and Nonsmokers. *Folia Histochem Cytopiol* 1999;37:25-30.
28. Wahlstrom J, Berlin M, Lundgren R, Olerup O, Wigzell H, Eklund A, et al. Lung and Blood T-cell Receptor Repertoire in Extrinsic Allergic Alveolitis. *Eur Respir J* 1997;10:772-779.
29. Albera C, Ghio P, Solidoro P, Marbitt I, Marchetti L, Pozzi E. Activated and Memory Alveolar T-lymphocytes in Idiopathic Eosinophilic Pneumonia. *Eur Respir J* 1995;8:1281-1285.
30. Walker Ch, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T Cells and Eosinophilia in Bronchoalveolar Lavages from Subjects with Asthma Correlated with Disease Severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:935-942.
31. Gratziou C, Carroll M, Montefort S, Teran L, Howarth PH, Holgate ST. Inflammatory and T-cell Profile of Asthmatic Airways 6 Hours after Local Allergen Provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:515-520.
32. Mukae H, Kohno S, Morikawa T, Kusano A, Kadota J, Hara K. Two Color Analysis of Lymphocyte Subsets of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Peripheral Blood in Japanese Patients with Sarcoidosis. *Chest* 1994;105:1474-1480.
33. Yu CT, Wang CH, Huang TJ, Lin HC, Kuo HP. Relation of Bronchoalveolar Lavage T Lymphocyte Subpopulations to Rate of Regression of Active Pulmonary Tuberculosis. *Thorax* 1995;50:869-874.
34. Sprince NL, Oliver LC, McLoud TC, Ginns LC. T-cell Alveolitis in Lung Lavage of Asbestos-exposed Subjects. *Am J Ind Med* 1992;21:311-319.
35. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:817-827.
36. Agostini C, Trentin L, Facco M, Sancetta R, Cerutti A, Tassirani C, et al. Role of IL-15, IL-2 and their Receptors in the Development of T Cell Alveolitis in Pulmonary Sarcoidosis. *J Immunol* 1996;157:910-918.
37. Cormier Y, Laviolette R. Persistent Bronchoalveolar Lymphocytosis in Asymptomatic Farmers. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:843-847.
38. Semenzato G, Agostini C, Zambello R. Lung T Cells in Hypersensitivity Pneumonitis: Phenotypic and Functional Analyses. *J Immunol* 1986;137:1164-1172.
39. Hamagami S, Miyagawa T, Ochi T. A Raised Level of Soluble CD8 in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis in Japan. *Chest* 1992;101:1044-1049.
40. Lynch DA, Newell JD, Logan PM. Can CT Distinguish Hypersensitivity Pneumonitis from Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Am J Roentgenol* 1995;165:807-811.
41. Murayama J, Yoshikawa Y, Ohtsuka M, Hasegawa S. Lung Fibrosis in Hypersensitivity Pneumonitis: Association with CD4+ but not CD8+ Cell Dominant Alveolitis and Insidious Onset. *Chest* 1993;104:38-43.
42. Semenzato G, Trentin L, Zambello R, Agostini C, Corpiani A, Marcer G. Different Types of Cytotoxic Lymphocytes Recovered from the Lungs of Patients with Hypersensitivity Pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:70-74.
43. Keller RH, Swartz S, Schlueter D, Bar-Sela S, Frank J. Immunoregulation in Hypersensitivity Pneumonitis: Phenotypic and Functional Studies of Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 1984;144:1744-1752.
44. Selman M, Teran L, Mendoza A, Camarena A, Martinez-Cordero E, Lezama M, et al. Increase of HLA-DR7 in Pigeon Breeder's Lung in a Mexican Population. *Clin Immunol Immunopathol* 1987;44:63-70.
45. Cordier G, Mornex JF, Brune J, Revillard JP. Flow Cytometry Assessment of Local T Cell Activation in Hypersensitivity Pneumonitis. *Ann N Y Acad Sci* 1986;465:362-369.
46. Mornex JF, Cordier G, Pages J, Vergnon JM, Lefebvre R, Brune J, et al. Activated Lung Lymphocytes in Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;74:719-727.
47. Gudmundsson G, Monick M, Hunninghake GW. IL-12 Modulates Expression of Hypersensitivity Pneumonitis. *J Immunol* 1998;161:991-999.
48. Agostini C, Calabrese F, Rea F, Facco M, Tosoni A, Loy M, et al. CXCR3 and its Ligand CXCL 10 are Expressed by Inflammatory Cells Infiltrating Lung Allografts and Mediate Chemotaxis of T Cells at Sites of Rejection. *Am J Pathol* 2001;158:1703-1711.
49. Campbell J, Brightling CE, Symon F, Quin A, Murphy KE, Hodge M, et al. Expression of Chemokine

- Receptors by Lung T Cells from Normal and Asthmatic Subjects.* J Immunol 2001;166:2842-2848.
50. Agostini C, Facco M, Siverio M, Carollo D, Galvan S, Catelan A, et al. *CXC Chemokines IP-10 and Mig Expression and Direct Migration of Pulmonary CD8+/CXCR3+ T Cells in the Lungs of Patients with HIV Infection and T Cell Alveolitis.* Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1466-1473.
 51. Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gsaperini S, Perin A, et al. *Involvement of the IP-10 Chemokine in Sarcoid Granulomatous Reactions.* J Immunol 1998;161:6413-6420.
 52. Weissler JC, Nicod LP, Lipscomb MF, Toews GB. *Natural Killer Function in Human Lung is Compartimentalized.* Am Rev Respir Dis 1987;135:941-994.
 53. Agostini C, Trentin L, Zambello R, Luca M, Cipriani A, Pizzolo G, et al. *Phenotypical and Functional Analysis of Natural Killer Cells in Sarcoidosis.* Clin Immunol Immunopathol 1985;37:262-275.
 54. Wilsher M, Hallowes M, Birchall N. *Gamma/delta Cells in Tissue from Patients with Sarcoidosis.* Thorax 1996;51:1123-1126.
 55. Raulf M, Liebers V, Steppert C, Baur X. *Increased γ/δ -positive T-cells in Blood and Bronchoalveolar Lavage of Patients with Sarcoidosis and Hypersensitivity Pneumonitis.* Eur Respir J 1994;7:140-147.
 56. Gruber R, Pforte A, Beer B, Riethmuller G. *Determination of Gamma/delta and other T Lymphocyte Subsets in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Peripheral Blood from Patients with Sarcoidosis and Idiopathic Fibrosis of the Lung.* APMIS 1996;104:199-205.
 57. Fahey JI, Taylor JMG, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian R, et al. *The Prognostic Value of*
 - Cellular and Serologic Markers in Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1. N Engl J Med 1990;322:166-172.
 58. Centers for Disease Control. *Guidelines for the Performance of CD4+ T Cell Determinations in Persons with Human Immunodeficiency Virus Infection.* Morb Mortal Wkly Rep 1992;41:8-16.
 59. Lang W, Perkins H, Anderson RE, Royce R, Jewell N, Winkelstein W Jr. *Patterns of T-lymphocyte Changes with Human Immunodeficiency Virus Infection: From Seroconversion to the Development of AIDS.* AIDS 1989;2:63-69.
 60. Soto-Perea C, Alvarado-Alemán FJ. *La fenotipificación inmunológica (CD3+, CD4+ y CD8+) por citometría de flujo en el paciente VIH positivo: presentación gráfica simplificada.* Enf Infect Microbiol 1994;14:184-190.
 61. Reyes-Terán G, Ponce de León-RS. *Conteo de células T CD4+ y su uso en el manejo de pacientes con VIH-1.* Rev Invest Clin 1993;45:363-370.

Correspondencia:

M en C. Felipe Mendoza Pérez,
Jefe del Laboratorio de
Inmunología.
Departamento de Biología Molecular.
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias. Calzada de Tlalpan
4502, Colonia Sección XVI. México,
DF, 14080.
Tel: 5666 45 39 extensión 270,
Fax: 5665 46 23
E-mail: femendo@yahoo.com

55

