# Tema de Actualidad

## Principios de Citometría de flujo

*Dra. Aurora Romero Coronel*, Blgo. Javier García León **.*

* *Médico Patólogo Instituto Oncológico SOLCA.*
** *Biólogo Instituto Oncológico SOLCA.*

### ABSTRACTO

Presentamos el área de Citometría de Flujo del Hospital Dr. Juan Tanca Marengo de SOLCA, cuya principal aplicación en el inmunofenotipaje de los desordenes hematopoyéticos constituye un complejo ejercicio que requiere entendimiento adecuado del linaje celular, vías de evolución , cambios fisiológicos y buena experiencia en hematopatología. Los procesos para los exámenes involucran tres pasos: pre-análisis (proceso del especimen, tinción con el anticuerpo), análisis (adquisición de datos en el citómetro de flujo) y post-análisis (análisis e interpretación de datos ). Este último sigue un proceso práctico y sistemático, utilizando plantillas madres que muestran el cálculo en porcentajes, "porcentaje positivo", para cada anticuerpo individual.

***Palabras Claves:*** *Citometría de Flujo*

### ABSTRACT

We present the flor cytometry area at the Dr. Juan Tanca Marengo Hospital, whose application in the inmunofenotyping of hemopoietics disorders constitute a complex exercise with perfect comprehension that the cellular lineage requires, the physiological ways of evolution, physiological changes and good experience in hematopathology. The processes for examinations involve three steps: pre-analysis (specimen process, antibody tincion), analysis (data acquisition in flow cytometry) and post-analysis (data and interpretation analysis). Its follows a systematic and practice process using groups who show calculate in percentage, positive percentage, for each individual antibody.

***Keys Words:*** *Flow citometry*

**Introducción.**

El Instituto Oncológico Nacional (ION) SOLCA preocupado en brindar un mejor servicio y atención a sus pacientes y a la comunidad en general, incorporó desde junio del 2004 el área de Citometría de Flujo como herramienta que permite correlacionar múltiples parámetros con mayor rapidez y realizar diagnósticos con mayor exactitud, sensibilidad y especificidad.[1,2,4]

El Citómetro de Flujo es un equipo con el cual podemos caracterizar y analizar células simultáneamente , contar, identificar y separar grupos particulares de células o partículas, este trabajo está basado en el uso de anticuerpos que reconocen y se adhieren a marcadores celulares específicos y así lograr caracterizar, cuantificar y evaluar tratamientos en pacientes con patologías hematológicas.[3,5]

Dra. Aurora Romero C.
Servicio de Patología
ION Solca Guayaquil
Av. Pedro Menéndez Gilbert (junto a la Atarazana)
Guayaquil - Ecuador

® Los Derechos de autor de los artículos de la Revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer.

La palabra Citometría proviene de Cito = Célula y Metría= Medida

El principio del Citómetro de Flujo es el paso de partículas o células que miden entre 0,2 y 50 micrómetros, a través del haz de un láser, así el equipo mide la capacidad de dispersión de luz, con lo que se determina el tamaño relativo de la célula o partícula; mientras que la fluorescencia que emite cada anticuerpo adherido, indica la granularidad o complejidad interna y la intensidad de la fluorescencia de cada tipo de célula. [1,3]

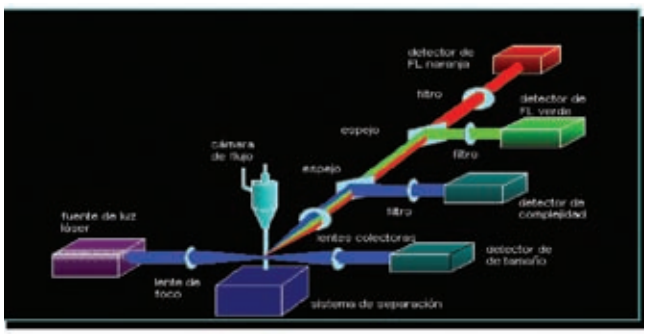
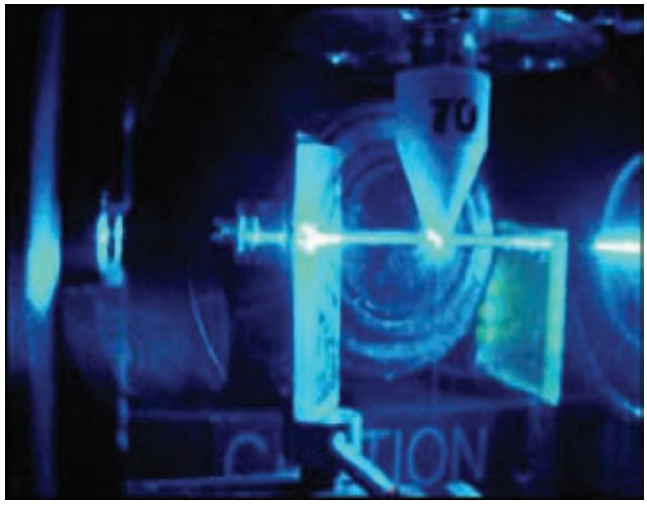



**Gráfico esquemático en la dispersión de luz y fluorescencia de un Citómetro de Flujo**

Los datos obtenidos se grafican en dispersogramas en donde se determina el porcentaje de cada población celular mediante un sistema electrónico, óptico y de fluidos.

**Sistema electrónico:** Basado en una fuente de iluminación láser. Tiene una configuración octogonal, es decir que son perpendiculares los ejes de iluminación, detección y paso de muestra.



El láser por acción de lentes tiene una sección elíptica y la intensidad de la luz decrece hacia la periferia. Su grosor se considera hasta que su intensidad ha disminuido del centro del haz al valor 1/e2, el cual es aproximadamente 100 µm de ancho. Algunos citómetros poseen dos o más láseres como fuentes de iluminación. [3-7]

La fluorescencia se recoge a 90 grados por lentes de alta apertura numérica. Recogen del 5 al 10 % de la fluorescencia emitida, pero con un espejo de diseño especial se puede llegar a recoger hasta el 90 %. Se debe situar una placa con un agujero (pinhole) para aumentar la razón señal/ruido. Por la lente que recoge la señal fluorescente también se recoge la señal de la luz dispersada a 90 grados (right angle scatter), que se lleva mediante espejos a su detector específico y es función de la refractariedad y estructura celular. [7]

Existe un detector para la luz dispersada hacia adelante o dispersión frontal de la luz (low angle scatter), que es función del tamaño celular.

La cámara de flujo puede ser cerrada o abierta según la lectura se realice en el seno de la cámara o una vez el líquido ha abandonado la misma, hay que tener en cuenta que las cámaras cerradas producen menos señal de ruido que cuando la lectura es en aire.[7]

El Citómetro de Flujo con el que contamos es un modelo FACS CALIBUR (Becton Dickinson) de penúltima generación.

**Protocolo para la obtención, transporte y conservación de muestras**

Como política institucional, el Hospital "Dr. Juan Tanca Marengo" ION-SOLCA, procesará muestras internas y externas que cumplan con los siguientes requisitos:

**Tipo de muestra :**

1. Las muestras aceptadas para el estudio de Citometría en leucemias, linfomas o VIH son: Médula ósea y sangre periférica en EDTA o Citrato de sodio.
2. Los requisitos para la recepción de las muestras son:
   - Impresión clínica, hematológica y/o patológica
   - Hoja de registro o, con un número de historia clínica.
3. Las muestras con heparina sódica no son procesables.

**Transporte de muestras**

Si la muestra es transportada por vía aérea deberá cumplir con las normas pertinentes de transporte de agentes biológicos que es determinada por la Dirección de Aviación Civil. Dentro de nuestras recomendaciones esta la de mantener cadena en frío a una temperatura de 4 a 8ºC 3 (Anexo).

**EXÁMENES QUE EFECTUA EL LABORATORIO DE CITOMETRÍA**

| EXAMEN | TIPO DE MUESTRA | TRANSPORTE DE MUESTRA | USO CLÍNICO | TIEMPO DE ENTREGA |
|---|---|---|---|---|
| CD4/CD8/CD3 **HIV** | Sangre periférica con EDTA | Cadena de frío óptimo **hasta** 24 horas | Seguimiento pacientes con HIV | 36 horas |
| LEUCEMIAS | Médula osea y sangre periférica con EDTA (2 ml) | Cadena de frío óptimo **hasta** 24 horas | Estadificación y seguimiento | 36 horas |
| CD45/CD20/CD5 **Enfermedad mínima residual** | Médula ósea y sangre periférica con EDTA (2 ml) | Cadena de frío óptimo **hasta** 24 horas | Estadificación y seguimiento | 36 horas |
| CONVENIO | Médula ósea y sangre periférica con EDTA (2 ml) | Cadena de frío óptimo **hasta** 24 horas | Diagnóstico,estadificación y seguimiento | 36 horas |
| DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES | Médula ósea y sangre del cordón umbilical | Cadena de frío óptimo **hasta** 24 horas | Reinserción de células madres | 1 hora |

**Conclusión:**

De los múltiples aplicaciones de la Citometría de Flujo en Solca nuestra labor esta enfocada en realizar :

1. Inmunofenotipo de muestras biológicas (sangre, médula ósea y ganglios linfáticos de pacientes con diagnósticos de leucemias y/o linfomas.
   Los resultados obtenidos unidos a información clínica confirman diagnóstico y determinan terapia de elección.
2. Determinación y enumeración de células CD4+(T-Ayuda) en el monitoreo de pacientes HIV positivos.
3. Determinación de células CD34 en Trasplantes Halogénicos.

Nuestro plan a futuro es trabajar en la determinación de ploidias para el análisis del contenido de la DNA o del RNA.

**Bibliografía**


1. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Clinical flow cytometry: principle and application. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993.
2. Coon JS, Weinstein RS, eds. Diagnostic flow cytometry. Baltimore: Willians & Wilkins, 1991.
3. Grogan WM, Collins JM. Guide to flow cytometry methods. New York: Marcel Dekker, 1990.
4. Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE, eds. Flow cytometry in clinical diagnosis. Chicago: ASCP Press, 1994.
5. Laerum OD, Bjerknes R, eds. Flow cytometry in hematology. London: Academic Press, 1992.
6. Macey MG, ed. Flow cytometry, clinical applications. Oxford: Blackwell, 1994
7. http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/carac.htm