

La citometría de flujo en el estudio de las citopenias inmunes

Flow cytometry in the study of immune cytopenias

Gilberto Soler Noda^{1*}

¹Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

*MSc. Gilberto Soler Noda. (rchematologia@infomed.sld.cu)

Recibido: 29/12/2018

Aceptado: 29/01/2018

La citometría de flujo es la tecnología empleada para el análisis de características físicas y químicas de partículas en fluidos sobre las que se les hace incidir, al menos, un láser. Para ello, los componentes celulares son marcados por compuestos fluorescentes que son excitados por el láser para que emitan luz en variadas longitudes de onda. La fluorescencia puede ser medida para determinar propiedades de las partículas como: granularidad, tamaño, intensidad de la fluorescencia, así como la complejidad interna; las que son recogidas por distintos detectores que analizan miles de células por segundo.⁽¹⁾

Estos instrumentos están formados con tres sistemas integrados: el *sistema de fluido* para el transporte de las partículas de 0.2 a 150 μm de tamaño, el *sistema óptico* conformado por el láser que incide sobre la partícula; la cual esparce el haz de luz para dos ángulos diferentes y el *sistema electrónico*, que convierte la señal lumínica en pulsos electrónicos que son procesados posteriormente. Los datos se presentan en forma de histogramas simples o puntos de correlación de parámetros los cuales son referidos como citogramas que muestran los datos como un conjunto de puntos.⁽¹⁾

Esta tecnología es empleada para el desarrollo de diferentes procedimientos como: conteo celular; clasificar, separar y escoger células; detección de biomarcadores; ingeniería de proteínas, entre otras.

Actualmente en el campo de la inmunohematología, el empleo de la citometría de flujo se utiliza en el diagnóstico de las citopenias inmunes. Estas citopenias se definen como la disminución de las cifras de eritrocitos, leucocitos (fundamentalmente polimorfonucleares neutrófilos) y plaquetas por debajo de los rangos establecidos en comparación con individuos de la misma edad, género, origen étnico y estado fisiológico; que puede ser provocado por la destrucción mediada por anticuerpos dirigidos contra elementos celulares particulares, con descompensación de la hematopoyesis para corregir el defecto y, de forma primaria por defecto en la producción medular por diferentes causas como complicación o secuela de una infección viral o provocada por un síndrome mielodisplásico. Cuando se debe a la acción de autoanticuerpos, constituyen un grupo de trastornos inmunes en los que los anticuerpos, el complemento y los macrófagos, que por lo general actúan de forma conjunta, condicionan que las células del paciente mueran de forma prematura e induce la aparición de anemias hemolíticas inmunes, leucopenias y trombocitopenias inmunes.

El empleo de esta tecnología en este campo se fundamenta en la unión específica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a un antígeno de superficie celular. La combinación de luz esparcida y fluorescencia, se recoge por los detectores los cuales producen signos electrónicos que son proporcionales a los signos ópticos recibidos.⁽¹⁾

En la inmunohematología eritrocitaria, la aplicación más importante de esta tecnología es en el estudio de las anemias hemolíticas autoinmunes Coombs directo negativo, que se producen por:⁽²⁾

- ✓ eritrocitos sensibilizados con número inferior de moléculas de inmunoglobulinas y fragmento del complemento por debajo del límite de detección del suero de Coombs (por defecto) o por un número excesivamente alto de estas moléculas que provocan inhibición estérica del suero antiglobulínico (exceso);
- ✓ eritrocitos sensibilizados con anticuerpos de los isotipos IgA e IgM y el suero de Coombs de rutina no posee anticuerpos contra estas inmunoglobulinas;
- ✓ eritrocitos sensibilizados con anticuerpos de baja afinidad por el antígeno y son removidos en el procedimiento de lavado;
- ✓ orientación errada de las moléculas de IgG que dificultan el establecimiento de los puentes interhematíes
- ✓ en la hemólisis producida por un mecanismo independiente de anticuerpos como ocurre en la citotoxicidad celular.

Además, se emplea en el estudio de reacciones transfusionales en que la prueba de Coombs no revela una población menor de células sensibilizadas con anticuerpos o que los aloanticuerpos sensibilizantes se encuentren a bajas concentraciones.⁽²⁾

En la inmunohematología, la citometría de flujo es el método más utilizado a nivel mundial y se emplea en el estudio de la trombocitopenia y neutropenia autoinmune; la trombocitopenia y neutropenia neonatal aloimmune; la púrpura postransfusional; la refractariedad plaquetaria; el edema pulmonar agudo asociado a la transfusión y las reacciones febriles; la trombocitopenia y neutropenia aloimmune asociada al trasplante; la trombocitopenia y neutropenia inmune inducida por medicamentos.

Estos avances permiten el estudio de las neutropenias y trombocitopenias inmunes; reacciones transfusionales por incompatibilidad que involucran antígenos específicos de granulocitos y plaquetas; la determinación de los grupos sanguíneos plaquetarios y granulocitarios; las pruebas de compatibilidad entre donante y receptor; todo lo cual se traduce en una disminución del riesgo de aloinmunización contra antígenos específicos de estas células y una mejor caracterización de la neutropenia y trombocitopenia autoinmunes.⁽³⁾ (Fig. 1)

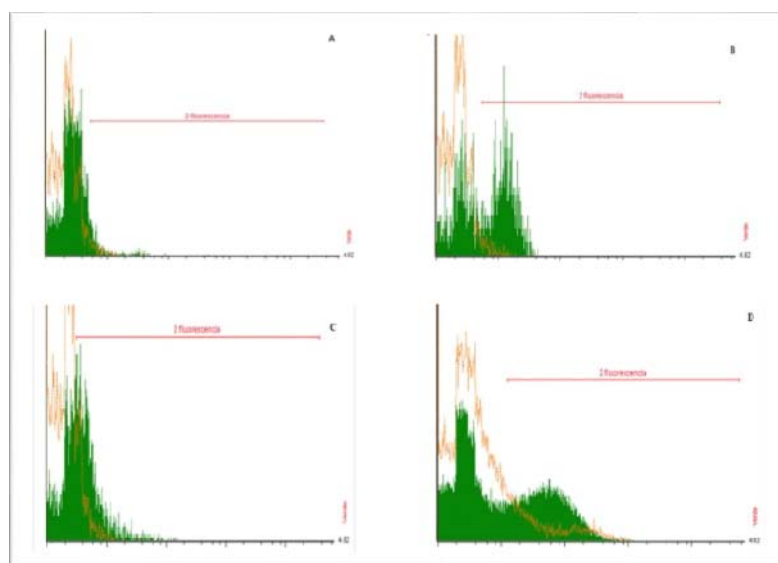


Fig. 1- Detección de anticuerpos antiplaquetarios por citometría de flujo.

A: Control negativo; B: anticuerpos positivos anti HPA; C: anticuerpos positivos anti HLA;
D: Prueba cruzada pretransfusional

Con un funcionamiento basado en la citometría de flujo, se encuentra el cribado de alto rendimiento, más conocido como tecnología Luminex®, que supuso una revolución en la

investigación y con el paso del tiempo se ha convertido en la forma más rápida y económica de evaluar de manera masiva grandes colecciones de compuestos o candidatos. Actualmente existen cribados de todo tipo que van desde el estudio de biomarcadores hasta la inmunoncología.⁽⁴⁾

La tecnología Luminex® se desarrolló para dar servicio a la creciente demanda de análisis masivos de datos o "*big data*". Se basa en un conjunto de perlas con un código de color diferente asignado a cada una. Cada tipo de perla se conjuga con un reactivo específico para cada analito de interés lo que permite cuantificar de manera simultánea varios analitos, lo que se conoce como sistema multiplex.⁽⁵⁾

El sistema multiplex permite analizar simultáneamente hasta 80 candidatos en un único pocillo utilizando volúmenes muy pequeños. Es muy sencillo, el láser detecta por un lado la perla marcada y por otro lado recoge la información sobre la detección de la muestra. Los estuches utilizan perlas de poliestireno o superparamagnéticas codificadas con diferentes colores y sensibilizadas con anticuerpos que reconocen el antígeno diana específico. Los analitos capturados son subsecuentemente detectados utilizando un *cocktail* de anticuerpos específicos biotinilados conjugados con estreptavidina-ficoeritrina. ⁽⁵⁾

En la inmunohematología plaquetaria y granulocitaria, esta tecnología es la más utilizada a nivel mundial, ya que permite analizar al mismo tiempo la presencia de anticuerpos contra antígenos específicos de plaquetas, granulocitos y anticuerpos dirigidos contra moléculas HLA de clase I y II; además de ofrecer el análisis de expresión génica y perfiles inmunológicos de forma rápida y eficiente; así como detección de DNA, RNA y proteína; todo desde una misma muestra. Todo ello se manifiesta en ahorro de tiempo y de recursos. Hasta el día de hoy, se trata de una tecnología muy consolidada y respaldada por cientos de publicaciones científicas.⁽⁶⁻⁹⁾

El empleo de estas tecnologías ha significado la necesaria optimización de la terapia transfusional con basamentos científicos y ahorro de sus recursos económicos, al permitir disminuir demandas innecesarias de hemocomponentes y los consiguientes gastos por concepto de promoción, captación de donantes, empleo de materiales consumibles y equipamiento, mano de obra profesional, entre otros. Permite además, cumplir exigencias sociales para garantizar la administración de sangre segura, establecer programas para minimizar efectos adversos en la aplicación de la terapia transfusional e incorporar métodos tecnológicos de avanzada en la obtención y procesamiento de los componentes de la sangre, así como aplicar y evaluar esquemas de hemoterapia eficaces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leach RM, Drummond M, Doig A, McKay P, Jackson B, Bain BJ. Practical low cytometry in haematology: 100 worked examples. West Sussex:John Wiley & Sons;2015.
2. Jeong-Shi L, Tsung-Chi H, Jau-Yi L, Ying-Ju C, Hsueng-Mei L, Cheng-Hwai T, et al. Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion*. 2009;49:1335-46. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02130.x
3. Leach M, Drummond M, Doig A. Practical flow cytometry in haematology diagnosis. West Sussex:John Wiley & Sons;2013.
4. Guarene M, Badulli C, Cremaschi AL, Sbarsi I, Cacciatore R, Tinelli C, et al. Luminex® xMAP® technology is an effective strategy for high-definition human leukocyte antigen typing of cord blood units prior to listing. *Int J Artificial Organs*.2018;41(5):284–8.
5. Baker HN, Murphy R, Lopez E, García C. Conversion of a Capture ELISA to a LuminexxMAP Assay using a Multiplex Antibody Screening Method. *J Vis Exp*. 2012;(65): 4084. DOI: 10.3791/4084
6. Rockenbauer L, Eichelberger B, Panzer S. Comparison of the bead-based simultaneous analysis of specific platelet antibodies assay (SASPA) and Pak Lx Luminex technology with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay (MAIPA) to detect platelet alloantibodies. *ClinChem Lab Med*. 2015;53(11):1779-83. DOI:10.1515/cclm-2014-1037
7. Lv H, Raddassi K, LipesMA. Luminex-Coupled EliFACS: A Multiparametric Method to Enumerate and Functionally Characterize Antigen-Specific T cells in Human Peripheral Blood. *Methods Mol Biol*. 2019;1899:197-210. DOI: 10.1007/978-1-4939-8938-6_14.
8. Chacko MP, Augustin A, David VG, Valson AT, Daniel D. Nonspecific positivity on the Luminex crossmatch assay for anti-human leukocyte antigen antibodies due to antibodies directed against the antibody coated beads. *Indian J Nephrol*. 2016 Mar-Apr;26(2):134-7. DOI: 10.4103/0971-4065.159305.
9. Kamburova EG, Kardol-Hoefnagel T, Wisse BW, Joosten I, Allebes WA, van der Meer A, et al. Development and Validation of a Multiplex Non-HLA Antibody Assay for the Screening of Kidney Transplant Recipients. *Front Immunol*. 2018 Dec 19;9:3002. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03002. eCollection 2018.