

La citometria com a eina per aprofundir en la complexitat dels organismes vius i les malalties

Jordi Petriz

Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras

Correspondència: Jordi Petriz. Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras. Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n. Edifici IMPPC. 08916 Badalona. Adreça electrònica: jpétriz@carrerasresearch.org.

DOI: 10.2436/20.1501.02.156

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 25/02/2015

Acceptat: 05/04/2015

Resum

Com el seu nom indica, la citometria de flux (FCM) és una tècnica que porta a terme mesures (*metria*) sobre les cèl·lules (*cito*) en un sistema de flux. El sistema fluidic facilita el flux de cèl·lules en un raig per ser analitzades d'una en una en diverses aplicacions multicolor relacionades amb la biologia o amb els estudis funcionals, així com un ampli ventall d'aplicacions en la recerca. Aquesta tecnologia combina elegantment la capacitat única per aïllar ràpidament poblacions pures de cèl·lules o partícules amb un conjunt específic de característiques biològiques. En combinació amb els assaigs més moderns de biologia molecular, es poden dur a terme experiments amb molt poques cèl·lules o fins i tot amb una cèl·lula individual per tal d'investigar la complexitat dels organismes pel que fa a la seva unitat de funció bàsica, la cèl·lula.

Paraules clau: citometria de flux, separació cel·lular, làser, fluorescència, FACS.

Citometria de flux i FACS

Avui dia molts laboratoris arreu del món fan servir la citometria de flux, i aquest article pretén fer un breu recorregut per aquesta tecnologia. Grans lectures molt recomanables són *Flow cytometry: first principles* d'Alice Givan i *Practical flow cytometry* de Howard M. Shapiro, i *Flow cytometry and sorting* de Myron R. Melamed, Tore Lindmo i Mortimer L. Mendelsohn, per a qui vulgui informació més detallada. També, cal recordar l'excel·lent compendi *Current protocols in cytometry* (John Wiley & Sons).

Acadèmicament, la citometria de flux és una tecnologia destinada a la quantificació de components o característiques estructurals de les cèl·lules, fonamentalment mitjançant mètodes òptics. Tot i que les mesures són fetes sobre cèl·lules individuals, permet processar milers de cèl·lules en pocs segons. La citometria de flux ha evolucionat ràpidament com a conseqüència del desenvolupament dels anticossos, en permetre conjugar fluorocroms i identificar diferents proteïnes estructurals en una suspensió cel·lular. La disponibilitat de làsers de diferents longituds d'ona com a font d'excitació, en associació amb sistemes fotodetectors i fotomultiplicadors, permet identificar múltiples paràmetres a escala de cèl·lula individual, com per exemple en mostres de sang perifèrica, medulla òssia o biòpsies tumorals, amb aplicacions habituals en el cas del diagnòstic i seguiment de malalties hemàtiques i immunitàries. La majoria d'institucions relacionades amb la investigació biològica disposen de citofluoròmetres. També són abundants en centres mèdics, i s'utilitzen tant per al diagnòstic com per a la investigació. El principal ús diagnòstic s'ha centrat en l'estudi del cicle cel·lular i de la ploïdia en càncer, en l'estudi de lim-

Cytometry as a tool to deepen the complexity of living organisms and diseases

Summary

As its name indicates, flow cytometry (FCM) is a technique that performs measurements (*metry*) on cells (*cyto*) in a flow system. A fluidic system facilitates the flow of cells one-by-one for single-cell analysis to be used in several multicolor applications for biology and for functional studies as well as a broad range of research applications. This technology elegantly combines the unique ability to rapidly isolate pure populations of cells or particles with a specific set of biological characteristics. In combination with modern molecular biology assays, experiments using very few cells or even single cells can be conducted to systematically uncover an organism's biocomplexity at its basic functional unit level, the cell.

Keywords: flow cytometry, cell sorting, laser, fluorescence, FACS.

fomes i leucèmies analitzant l'expressió de marcadors de superfície importants per al diagnòstic, així com el seu valor pronòstic associat. Encara que actualment hi ha alternatives menys costoses a la citometria de flux, continua essent el mètode emprat en el recompte dels nivells de cèl·lules CD4 i CD8 en la sang de pacients amb la síndrome d'immunodeficiència adquirida. Addicionalment, l'ús de la citometria de flux també és clau, actualment, en altres camps allunyats de la pràctica clínica, com són la citometria subcel·lular per permetre l'estudi d'estructures i esdeveniments relacionats amb la reparació del DNA o el monitoratge del plàncton mitjançant citometria acústica.

Lacrònim FACS (*fluorescence activated cell sorting*) és una marca registrada per un dels principals fabricants de citòmetres i sovint es fa servir com a sinònim de citometria de flux. També es reconeix incorrectament que Len Herzenberg va desenvolupar el primer separador cel·lular activat per fluorescència. De fet, va ser desenvolupat per Mack Fulwyler, Marv Van Dilla, John Steinkamp i James Coulter. Fulwyler i els seus col·laboradors van adaptar el principi de deflexió de les impressores de raig de tinta desenvolupat per Richard Sweet per separar cèl·lules (Sweet, 1965). Més o menys al mateix temps, Lew Kametsky va desenvolupar un separador cel·lular basat en un sistema d'interrupció fluidica. Tant els separadors de Fulwyler i de Kametsky van ser desenvolupats per aïllar cèl·lules i validar la finalitat analítica de tots dos instruments. Len Herzenberg va tenir la visió d'entendre com seria d'important la separació cel·lular per desentrañar la complexitat del sistema immunitari (Hulett *et al.*, 1973). Les seves contribucions científiques després d'haver treballat amb el separador de Kametsky van concloure amb la comercialització d'un

instrument equipat amb un làser d'alta potència. Així, podria aprofitar els anticossos monoclonals conjugats a fluorocroms i aïllar diferents poblacions cel·lulars del sistema immunitari. Aquest concepte, però, va ser proposat per primera vegada per Mac Fulwyler i col·laboradors, i també per Richard Sweet.

Fonaments de la citometria de flux

En el moment de fer les mesures en el citòmetre de flux, les cèl·lules poden estar vives o fixades, obligadament en suspensió cel·lular i preferiblement en forma de cèl·lula individual. Un flux amb enfocament hidrodinàmic o també acústic les obliga a passar alineades davant d'un feix làser de manera continuada, a manera d'un raig prim de la suspensió cel·lular. Cada cèl·lula, alhora que dispersa la llum, emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació làser a la qual és sotmesa. Els paràmetres que típicament es mesuren de manera simultània per a cada cèl·lula són:

- a) Dispersió frontal de la llum (*forward scatter*), proporcional a la grandària cel·lular.
- b) Dispersió ortogonal de la llum (*side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o complexitat de la cèl·lula.
- c) Intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona.

La dispersió de la llum per si sola resulta de força utilitat. Normalment s'utilitza en l'exclusió de les cèl·lules mortes, agregats i restes cel·lulars, així com per reduir el soroll de fons en la mesura de la fluorescència. És suficient per discriminar limfòcits de monòcits i granulòcits en mostres leucocitàries hemolisades. La dispersió de la llum també es pot utilitzar en la quantificació de l'agregació de les cèl·lules vives.

Convencionalment, les intensitats de fluorescència es mesuren a diferents longituds d'ona i de manera simultània per a cadascuna de les cèl·lules. Per tal de mesurar els components d'interès de cadascuna de

.....
 ↓ **Figura 1.** Comptador fotoelectrònic de partícules col·loïdals. També conegut com el comptador de Gucker, va ser desenvolupat amb el suport de l'exèrcit dels Estats Units com un citòmetre de flux per a la detecció de bacteris en els aerosols. Els resultats de la invenció van ser publicats durant la Segona Guerra Mundial i van romandre com a classificats, ja que la seva finalitat consistia a detectar bacteris i espores d'ús en la guerra biològica. L'aire filtrat es conduïa a una zona de confinament i generava un corrent cap a la part central de la càmera de flux, sotmesa a il·luminació de camp fosc. L'aparell tenia una capacitat de detectar partícules de 0,6 µm de diàmetre amb una probabilitat del 60 %. Els exèrcits moderns continuen finançant projectes basats en la utilització de la citometria de flux per identificar soques de patògens amb mètodes d'identificació molt més sofisticats.

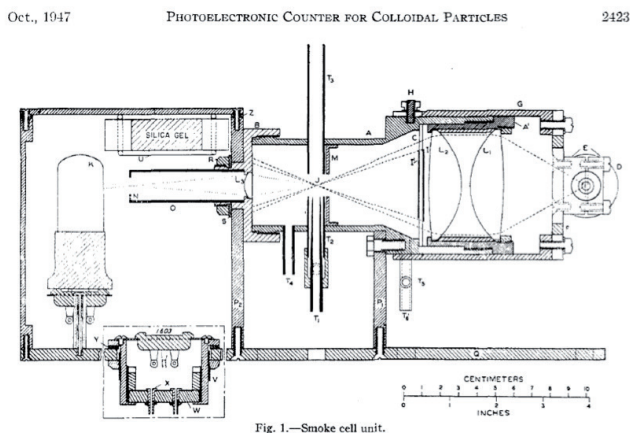
les cèl·lules, és possible utilitzar diferents sondes fluorescentes. Els anticossos conjugats a fluorocroms són utilitzats molt sovint en la quantificació de la densitat antigènica de determinats marcadors i per distingir subpoblacions de tipus cel·lulars diferenciats, fins i tot aquelles cèl·lules amb expressió de transgens. Mitjançant la conjugació a fluorocroms, es poden fer mesures de la unió de virus i hormones als seus receptors corresponents. També es poden analitzar components intracel·lulars mitjançant sondes fluorescentes específiques, com ara el contingut cel·lular de DNA (permet estudis de cicle cel·lular i ploïdia), el DNA sintetitzat *de novo*, seqüències nucleotídiques específiques, RNA missatger, filaments d'actina i, en definitiva, qualsevol estructura per a la qual existeixi un anticòs o una sonda fluorescent disponible. La citometria de flux es pot utilitzar a més en el monitoratge de canvis en el calci intracel·lular, del potencial de membrana, el pH, o en el contingut d'àcids grassos.

Els citòmetres de flux consisteixen en sistemes fluidícs, òptica làser, detectors electrònics d'amplificació logarítmica del senyal, ara reemplaçats pel processament digital del senyal en els citòmetres més moderns, i ordinadors. Els sistemes òptics permeten l'enfocament làser en un feix amb un diàmetre reduït per impactar sobre el menor nombre de partícules possibles simultàniament. El sistema fluidic permet un enfocament hidrodinàmic o acústic del flux cel·lular, fins a aconseguir l'alineament de les partícules o cèl·lules, i en els separadors cel·lulars o *cell sorters*, es produeix un trencament del flux en gotes de mida uniforme per aconseguir la separació d'esdeveniments individuals (cèl·lules, cromosomes, fragments de DNA, etc.). En aquests separadors, el sistema electrònic s'encarrega de la quantificació dels centelleigs de fluorescència i de la llum dispersada i, sota el control de l'ordinador, s'aconsegueix la càrrega elèctrica de les gotes que contenen les cèl·lules d'interès per poder sotmetre-les a deflecció i recollir-les en tubs específics per a tal fi, o sobre els pouets de plaques de cultiu de teixits. L'ordinador permet emmagatzemar dades de milers de cèl·lules per a cada mostra i representar els resultats gràficament.

Una «no tan breu» història de la citometria

Els orígens de la citometria es poden remuntar a l'any 1680, quan Antonie Philips van Leeuwenhoek (Leeuwenhoek, 1720) va ser el pioner a fer recomptes d'eritròcits de pollastre dins d'un capillar graduat. En aquella època els únics colorants disponibles eren d'origen natural, com el safrà, i el va fer servir per tenyir cèl·lules musculars. Als voltants del 1880, Paul Ehrlich va fer servir per primera vegada sondes àcides i bàsiques que van servir per identificar leucòcits acidofílics, eosinofílics, basofílics i neutrofilílics, i per estudiar les dinàmiques dels fluids cel·lulars va fer servir la fluoresceïna. La majoria d'aquestes sondes s'obtenien de la indústria tèxtil, i cal recordar que aquesta classificació dels leucòcits encara segueix vigent avui dia. Als voltants del 1900, Pappenheim i Unna van combinar el verd metil i la pironina per tal de tenyir els nuclis cel·lulars de color verd i el citoplasma de color vermell.

Ja l'any 1904, August Köhler, a Alemanya, va obtenir les primeres microfotografies de cèl·lules epidèrmiques mitjançant excitació ultraviolada i microscòpia òptica, i va obrir les portes a la utilització de sistemes alternatius per visualitzar estructures intracel·lulars. No obstant això, Paul Ehrlich, uns cinquanta anys abans, ja havia utilitzat la fluoresceïna com a primer exemple d'utilització de molècules fluorescentes aplicades a l'estudi de la dinàmica dels fluids oculars. El 1925, Robert Feulgen va demostrar que el DNA es trobava al nucli de les cèl·lules, tant en plantes com en animals, gràcies a la utilització d'una reacció que precisament porta el seu nom, i permet la tinció del DNA i visu-



alitzar-lo. Pocs anys després, Andrew Moldavan (Moldavan, 1934) va publicar a *Science* un treball en el qual descrivia la primera temptativa per adaptar els mètodes fotoelèctrics al recompte cel·lular i de partícules microscòpiques en suspensions aquoses al llarg d'un tub capil·lar de vidre. El 1941 Tobjorn Casperson va demostrar gràcies a la utilització d'agents capaços de revelar els àcids nucleics que aquests, més enllà de ser productes residuals, participaven activament en els processos de síntesi proteica. El mateix any, Albert H. Coons i els seus col·laboradors van ser els primers a conjugar un anticòs a una molècula fluorescent i els van fer servir per tal d'identificar antigens en talls de teixits, mentre que Papanicolau establia la classificació del càncer d'úter mitjançant els seus estudis pioners de citologia exfoliativa. Tres anys més tard, Oswald T. Avery va descobrir l'anomenat *principi transformant*, i va demostrar que el DNA era el responsable d'emmagatzemar la informació genètica. Ja el 1951, i utilitzant la tinció Feulgen, de nou Casperson va demostrar que tant el DNA com l'RNA s'incrementava en cèl·lules que creixien activament. Va ser cinc anys després quan Wallace H. Coulter va desenvolupar el comptador Coulter, el primer sistema d'alta velocitat per al recompte de cèl·lules sanguínies, a més de permetre diferenciar-les per la seva grandària. I un any més tard, James C. Parker i William R. Horst van presentar la primera patent d'un aparell de recompte automàtic de cèl·lules sanguínies basat en dos colors. Mentrestant, el 1953, P. J. Crosland-Taylor va publicar a *Nature* el desenvolupament d'un sistema per al recompte de partícules suspeses en un fluid a través d'un capil·lar (Crosland-Taylor, 1953), que va suposar el principi del desenvolupament del fluid acompanyant (*sheath flow*). Aquell mateix any, Watson i Crick descobrien la doble hèlix. Uns anys abans, Gucker (1947) havia desenvolupat un primer citòmetre per a la detecció de bacteris en aerosols, l'anomenat *comptador fotoelèctric* per a partícules col·loïdals. Aquests estudis es van fer durant la Segona Guerra Mundial i van romandre com a classificats, ja que el seu ús estava relacionat amb la identificació de bacteris i d'espores suspeses en l'aire emprades per la guerra biològica. Aquest instrument feia servir una làmpada dels fars d'un cotxe Ford, juntament amb un detector fotomultiplicador associat a una càmera de camp fosc (vegeu la figura 1).

En el període comprès entre 1956 i 1975 es produeix un gran salt tecnològic, tant en la utilització de fluorocroms com en el desenvolupament dels primers sistemes basats en el flux de la mostra. Preston l'any 1951 i Marvin Lee Minsky (1953) presentaven el primer citoanalitzador i les bases del primer microscopi confocal, respectivament. A partir de 1964, Louis Kametsky descriu a *Science* el desenvolupament d'un nou aparell, l'anomenat *espectrofotòmetre*, per a l'anàlisi cel·lular ultrarràpida (Kametsky *et al.*, 1965) i per a la separació cel·lular. Aquest mateix any, Mack Fulwyler i Marvin van Dilla al laboratori de Los Álamos desenvolupen el primer separador cel·lular basat en el mateix principi de Coulter per a la diferenciació de les cèl·lules (Fulwyler, 1965).

Mentre es produïa aquest gran salt tecnològic, en paral·lel es va produir un gran salt en l'anàlisi cel·lular. L'any 1956, Von Bertalanffy i Bickis van fer servir el taronja d'acridina per identificar l'RNA, mentre que aquell mateix any Wallace Coulter comercialitzava el comptador Coulter. Només un any més tard, Marcos Boris Rotman, amb una trajectòria científica multidisciplinària absolutament atípica, va demostrar per primera vegada la possibilitat de mesurar molècules úniques de β -galactosidasa mitjançant sistemes microfluídics i substrats fluorogènics. Cal destacar un nom, el de Marylou Ingram, que ràpidament es va adonar de la precisió del recompte hemàtic desenvolupat per Coulter, i va ser una de les pioneres dels estudis més primerencs en la recerca de

April 30, 1968 M. J. FULWYLER 3,380,584
PARTICLE SEPARATOR

Filed June 4, 1965 5 Sheets-Sheet 1

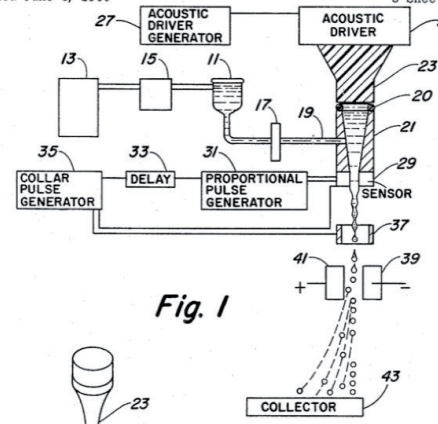


Fig. 1

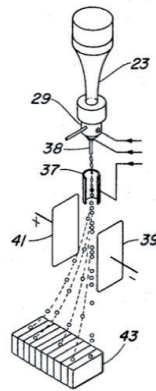


Fig. 2

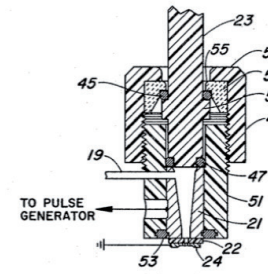


Fig. 3

INVENTOR,
Mack J. Fulwyler

BY
[Signature]

Figura 2. Separador de partícules de Fulwyler. Reproducció d'una part de la patent original del 1968 que ensenya un diagrama esquemàtic de la invenció (Fig. 1), la disposició del sistema de l'embocadura i del sistema de deflexió (Fig. 2), així com una secció de l'embocadura adaptada per produir el raig i transmetre de manera eficient l'energia vibratòria que permeti una formació de gotes uniforme.

les cèl·lules sanguínies. L'any 1963 va descriure la presència de limfòcits binucleats després de la irradiació, una fita fonamental per entendre els efectes biològics de la radiació ionitzant. Precisament, Preston (1964) va dissenyar un citoanalitzador per estudiar les cèl·lules que detectava Ingram amb una freqüència 1/10.000, i va digitalitzar imatges de limfòcits prèviament tenyits amb combinacions d'eosina i blau de metilè. Mortimer Mendelsohn, Brian Mayall i Judith Prewett aquell mateix any també van fer contribucions molt importants per a les imatges digitalitzades, i específicament centrades en l'automatització de l'anàlisi dels cromosomes. En els tres anys següents, Hallerman i col·laboradors, Kosenow (1964), Marcos Boris Rotman (1966) i Marvin Van Dilla i Harry Krisman (1967) van fer possible la discriminació de leucòcits dels eritròcits amb tinció de taronja d'acridina, l'estudi de les propietats de les membranes de cèl·lules viables de mamífer mitjançant la hidròlisi enzimàtica dels èsters fluorogènics, i de la tinció fluorescent del DNA amb el microfluoròmetre de flux de Los Álamos, respectivament.

També en aquells dies, la invenció de la impressora electrostàtica de raig de tinta feta per Dick Sweet va possibilitar que en aquell mateix any

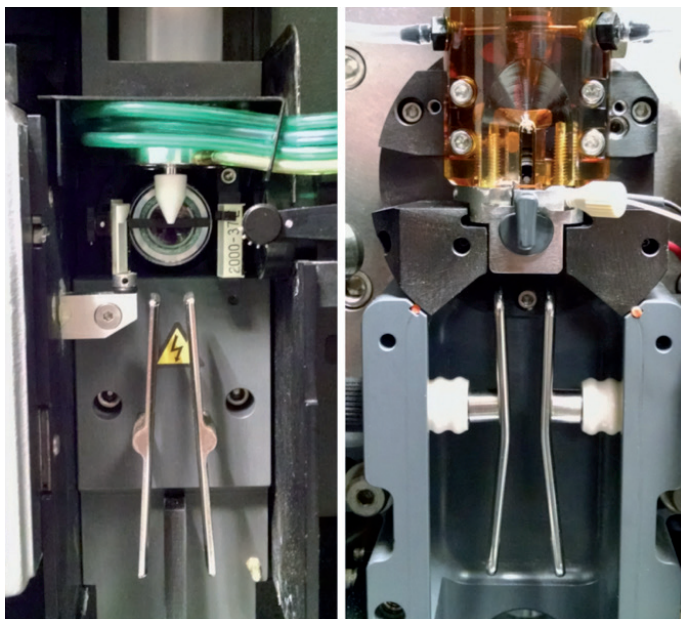
Mack Fulwyler (1965) inventés el separador celular electrostàtic, una de les invencions més significatives en el camp de l'anàlisi celular (vegeu les figures 2 i 3). Fulwyler va ser molt brillant, especialment per la capacitat de connectar dues idees inicialment desconnectades i llunyanes: el recompte de cèl·lules vermelles inventat per Coulter i l'oscil·lògraf de raig de tinta de Sweet, per separar finalment cèl·lules. Lord Rayleigh l'any 1879 havia demostrat que els fluids que emergien d'orificis de diferents maneres eren inestables i que tendien a formar gotetes, i que sense aplicar una força externa al flux, el patró de les gotetes era impossible de predir (Strutt, 1879). I aquesta troballa és la que va inspirar Sweet per tal d'inventar la seva impressora (Sweet, 1965).

El primer equip de citometria de flux basat en l'ús de fluorescència (ICP-11) va ser desenvolupat el 1968 per Wolfgang Göhde de la Universitat de Münster (Alemanya) i comercialitzat entre 1968 i 1969 pel fabricant alemany Partec mitjançant Phywe AG (Göttingen). Fins llavors, els mètodes basats en l'absorció de la llum eren molt més habituals entre els científics que els basats en sondes fluorescents. La denominació original per a la tecnologia desenvolupada en aquests moments va ser la de citofotometria de pols (de l'alemany *Impulszytphotometrie*). Deu anys després i amb motiu de la reunió de la Fundació d'Enginyeria Americana a Pensacola (Florida), es va adoptar la denominació actual de citometria de flux, i ràpidament va ser acceptada. A partir de llavors es van desenvolupar nous instruments de citometria, incloent-hi el *cytograph* (1970) de Kamensky, el citofluorògraf de Bio/Physics Systems Inc. (1970) (després Ortho Diagnostics), el PAS 8000 de Partec (1973), el primer FACS de Becton Dickinson (1973), el separador TPS-1 de Coulter Electronics (1975), l'IPC-22 de Partec/Phywe (1975) i l'EPICS de Coulter (1977).

L'avanç més significatiu, en l'àmbit biomèdic, es va deure sens

.....
 † Figura 3. Una mirada de ben a prop a l'evolució dels separadors cel·lulars.

Al llarg de molts anys, tant els citòmetres de flux com els separadors cel·lulars electrostàtics han mantingut un disseny molt semblant al descrit en la patent original del separador de partícules de Fulwyler. En aquestes dues imatges es pot comprovar la similitud de l'espai del separador on la suspensió cel·lular, a manera d'un raig prim, és exposada a il·luminació làser de manera continuada, abans de la separació física de les cèl·lules d'interès.



dubte a la producció d'hibridomes de Köhler i Milstein i a l'obtenció d'anticossos monoclonals altament específics per als seus antígens diana i apropiats per ser conjugats amb fluoresceïna, ficobiliproteïnes i altres fluorocroms. Un altre pas important va ser el descobriment de la proteïna fluorescent verda (GFP), obtinguda a partir de la medusa *Aequorea victoria*. Un cop clonat el gen que la codifica, s'utilitza actualment en nombrosos estudis com a gen marcador, en ser detectable fàcilment mitjançant tècniques de fluorescència. I mentre anava creixent el catàleg dels CD, noves proteïnes i sondes fluorescents, nous fluorocroms i els seus tàndems, la tecnologia seguia evolucionant. Robinson i col·laboradors l'any 1991 van presentar els principis d'automatització amb la incorporació dels lectors de codis de barres als citòmetres comercials. Entre els anys 1991 i 1995, van den Engh va desenvolupar la separació cel·lular d'alta velocitat, que ara incorporen la majoria de separadors cel·lulars, i Roederer en el període comprès entre el 1997 i el 2004 (Baumgartha *et al.*, 2000) presentava els seus resultats amb estudis de fenotip policromàtics fins amb disset colors (Perfetto *et al.*, 2004). Actualment, molts citòmetres comercials permeten detectar fins a catorze colors simultàniament, i estan equipats amb tres o quatre làsers.

La citòmica en el segle XXI

Actualment es poden trobar dades publicades obtingudes mitjançant citometria de flux en qualsevol tipus de revista científica, ja sigui en el camp de la biologia cel·lular, medicina, microbiologia, protistologia, ecologia, limnologia, oceanografia, entre moltes altres disciplines. Prova d'això és la gran quantitat d'articles publicats en revistes científiques que presenten resultats obtinguts amb aquesta tecnologia (més de 159.000 en la base de dades PubMed en el moment d'escriure aquest article).

La necessitat d'analitzar diversos paràmetres simultàniament es ha portat a la citometria policromàtica. El gran potencial d'aquesta tecnologia es veu limitat pel solapament dels diferents espectres d'emissió dels fluorocroms, i requereix complexos sistemes d'algoritmes per a l'anàlisi, així com l'ús de nombrosos controls per minimitzar a més l'autofluorescència i la correcció de la contaminació de color. No obstant això, l'anàlisi de tal magnitud de dades amb la possible identificació de nous fenotips cel·lulars suposa un obstacle per a l'aplicació generalitzada d'aquesta tecnologia. Petraush *et al.* (2006) van aconseguir identificar trenta-dues subpoblacions de limfòcits T per a dues condicions diferents de cultiu, en limfòcits de ganglis limfàtics criopreservats de pacients amb melanoma vacunats amb un pèptid modificat. Les cèl·lules es van adquirir en un citòmetre amb panells de vuit colors i les dades es van analitzar mitjançant algoritmes d'anàlisi jeràrquica i seqüencial de clústers per a l'obtenció del percentatge relatiu de cada subfenotip. Segons els autors, la tecnologia descrita i utilitzada en el seu treball és ràpida i efectiva per a l'estudi de patrons complexos d'expressió de subfenotips i entre diferents mostres, i conclouen que pot promoure l'ús de la citometria policromàtica per a aplicacions tant clíniques com de recerca. Entre els anys 1997 i 2001 ja s'havia aconseguit passar de cinc colors a onze (Rosa *et al.*, 2001), encara que aquesta tecnologia estava disponible a molts pocs laboratoris arreu del món. L'any 2007, també fent servir vuit colors, es va posar de manifest la classificació del gran nombre de subpoblacions obtingudes amb anàlisi dels clústers i amb l'anàlisi del component principal per tal de simplificar les dades multicolor i la visualització (Lugli *et al.*, 2007).

Aquests aspectes tenen repercussions molt importants en el diagnòstic clínic, ja que molts assaigs necessiten la utilització del citòme-

tre de flux. Un programari d'aplicabilitat clínica ha de tenir diferents requisits en funció de l'aplicació específica, i el propòsit general ha de comprendre la visualització, la segmentació, el recompte, la interpretació i la generació dels informes corresponents. La visualització es basa en la transformació de les dades, mitjançant la compensació electrònica, la utilització del tipus d'escala (lineal, logarítmica i biexponencial), i l'anàlisi del component principal, per tal d'assolir una representació comprensible. La segmentació pretén identificar les poblacions, ja sigui per sobre o per sota d'una determinada intensitat de fluorescència, encerclada per una regió poligonal, per modelització de l'estat de probabilitat, o mitjançant algorismes de clusterització. De manera molt important, ja sigui amb procediments manuals, supervisats o automatitzats, han de permetre la comparació amb dades de referència.

A mesura que avança la tecnologia relacionada amb la citometria ha anat creixent la capacitat multicolor. Amb vista a aplicacions específiques, per exemple en l'àmbit del diagnòstic mèdic, és important destacar que molts assaigs no estan sotmesos a cap regulació que en permeti la comparació amb dades externes, ja sigui segons rangs de referència, per criteris clínics de classificació, i per la significació clínica que aquests resultats tinguin en cada activitat professional concreta. Per tant, és fonamental la identificació de possibles fonts d'error, començant per l'etiquetatge incorrecte, i passant per la manca de validació de l'assaig, o per la presència d'artefactes. En la pràctica clínica les conseqüències de l'error es poden traduir en un diagnòstic incorrecte, ja sigui no reconeixent la presència de malaltia, sobreinterpretant-la, o classificant-la inadequadament. Un recompte inexacte de cèl·lules malignes pot implicar una teràpia inadequada en el tractament de la malaltia residual mínima. Cal tenir present, doncs, que els resultats clínics són resultats d'un assaig i que tot assaig requereix una validació especialment rigorosa en l'àmbit clínic, i que si el programari falla, un assaig mai no podrà ser validat.

L'objectivitat en l'anàlisi dels assaigs obtinguts mitjançant citometria és d'especial importància. L'any 2008, la Societat Internacional de Citologia Analítica (ISAC) i altres societats interessades van introduir una nova recomanació per al registre i la transmissió d'informació sobre els detalls experimentals de citometria de flux —incloent-hi mostres, instrumentació i anàlisi de dades— coneguts com la informació mínima sobre un experiment de citometria de flux (MIFlowCyt). MIFlowCyt s'ha desenvolupat de manera coordinada amb requisits ja inclosos en els experiments d'alt rendiment i, en conjunt, aquestes recomanacions constitueixen el projecte d'informació mínima per a la recerca biològica i biomèdica (MIBBI, *minimum information for biological and biomedical investigations*) (Taylor *et al.*, 2008). D'altra banda, hi ha serveis que faciliten l'avaluació externa de la qualitat integral i proporcionen directrius als laboratoris clínics per a l'atenció òptima dels pacients. Mitjançant l'educació i la promoció de millors pràctiques, diferents organitzacions supranacionals estan treballant per millorar la comparabilitat i la fiabilitat dels resultats experimentals obtinguts mitjançant citometria de flux (i altres), amb independència d'on es duen a terme. Tot i que la citometria de flux es porta a terme sobretot en un context d'investigació, el marc esmentat abans també està contribuint a disminuir la variabilitat en els estudis clínics.

La citometria de flux policromàtica avançada (amb la participació de setze o més colors simultàniament) ha afegit més complexitat als estudis immunofenotípics (Roederer, 2002). Els controls FMO (*fluorescence minus one*) són, ara com ara, la millor opció per identificar amb precisió les cèl·lules diana en aquest entorn. Però, són tots els laboratoris

econòmicament i tècnicament capaços d'incloure controls FMO per a la normalització d'aquests estudis? I com podem convèncer els gerents dels diferents hospitals sobre la necessitat d'utilitzar aquests controls òptims en entorns clínics malgrat que tenen més cost?

Des del 1995, els grups de treball de la Societat Ibèrica de Citometria (SIC) han donat suport al control de qualitat de molts laboratoris d'Espanya i de Portugal, amb l'objectiu de reduir tant la variació intralaboratori i interlaboratoris dels resultats obtinguts amb la citometria de flux. Un laboratori de referència coordina una sèrie d'estudis d'intercalibració, i els resultats es discuteixen activament en les reunions territorials. L'experiència del grup de treball de la SIC en el recompte de cèl·lules CD34+ ha llançat més llum sobre els estudis de comparació entre laboratoris. Mitjançant un estudi multicèntric *in silico* per centrar-se en la subjectivitat de l'anàlisi per citometria un laboratori de referència va enviar arxius de dades representatives de diferents recomptes de les cèl·lules CD34+. Les mostres s'havien tenyit i adquirit en el laboratori de referència d'acord amb un protocol consensuat per al recompte absolut de cèl·lules CD34+. Sorprenentment, els resultats d'aquest estudi van mostrar coeficients de variació entre laboratoris molt elevats.

Per tots aquests motius, la formació professional específica ajudarà a disminuir la variabilitat relacionada amb la subjectivitat que observem. Els nous esforços per incloure estudis *in silico* en projectes com el d'immunologia humana podrien contribuir substancialment a l'estandardització del fenotipatge. A més, estratègies supranacionals consensuades ajudarien a generar patrons de referència i bases de dades citòmiques, un fet que permetria la integració amb bases de dades genòmiques i proteòmiques existents.

Un futur immediat

La necessitat creixent de mètodes multiparamètrics per al coneixement de complexos sistemes cel·lulars, i concretament de la resposta de cèl·lules tumorals a diferents tractaments oncològics, ha impulsat el desenvolupament de la citometria de masses, i ha combinat l'espectrometria de masses amb fonaments de la citometria de flux per superar les limitacions esmentades de la fluorescència.

Mitjançant la citometria de masses es poden analitzar simultàniament fins a trenta-cinc, i potencialment cent, marcadors diferents en una cèl·lula. La novetat està en l'ús de metalls, els lantanoides, com a marcadors dels anticossos monoclonals i substituint la conjugació amb fluorocroms. Els avantatges de l'ús d'aquests metalls com a marcadors són diversos: són molt minoritaris en les mostres biològiques, i redueixen el senyal de fons. A més, es poden utilitzar isòtops estables i elevar el nombre possible de combinacions, amb la qual cosa s'ofereix una resolució màxima per al nombre possible de canals de massa (Bandura *et al.*, 2009).

La citometria fotoacústica intravital és ja una realitat avui dia i probablement serà implementada en els pròxims anys per tal de detectar cèl·lules tumorals circulants, així com cèl·lules mare tumorals. Alhora, el desenvolupament de nous fluorocroms basats en polímers sintètics orgànics permetran uns marges més amplis en el rang de colors per utilitzar amb uns espectres de solapament inferiors al 5 %. Els sistemes microfluídics suposaran també un gran ventall de possibilitats per aïllar les cèl·lules d'interès alhora que s'aniran desenvolupant sistemes d'alta velocitat de captura d'imatge en flux, de detectors multispectrals, assaigs lliures de marcatge, i especialment, sistemes que permetin arribar a una sensibilitat de detecció de molècula única fent possibles sistemes de recompte i de concentració a escala molecular.

Una de les fronteres està relacionada amb la instrumentació de recerca, que permetrà la programació de l'operador en funció del disseny experimental, mentre que els sistemes clínics tendiran a ser completament automatitzats. Després de més de trenta anys, la citòmica ha entrat en una nova era per permetre descobertes revolucionàries en la biologia, s'incrementarà la qualitat del monitoratge de processos biotecnològics i es milloraran els diagnòstics clínics i les teràpies cel·lulars, no solament allargant la supervivència dels pacients, sinó també millorant-ne la qualitat de vida.

Reflexions (i «refraccions») finals

Més enllà de la descripció característica de la citometria de flux que es pot trobar arreu de molts documents i revisions, cal deixar molt clara la distància que hi ha entre la potencialitat d'aquesta tecnologia i com aplicar-la correctament. Malgrat que avui dia hi ha més de 15.000 citofluoròmetres repartits per tot el món, només una fracció molt petita dels operadors tenen algun tipus d'acreditació del coneixement en la matèria. La International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) és pionera en aquest sentit, i posa a disposició de la comunitat científica una acreditació internacional que ofereix les proves dels coneixements, de l'experiència, i que cal renovar cada tres anys. Des de l'any 2011, la ICCE (International Cytometry Certification Examination) ha certificat 191 citometristes arreu del món. Tenint en compte

que el mercat global de la citometria de flux assolirà els 5.700 milions de dòlars l'any 2018, això podria suposar un greu desequilibri entre la balança del coneixement, la tecnològica, i per tant, en la qualitat de la prestació de serveis i la validació dels resultats. En paral·lel, la Societat Ibèrica de Citometria (SIC) està conduint uns esforços que permetin establir les categories d'operador de citòmetres de flux i d'operador de separadors cel·lulars, i no solament en l'àmbit clínic i del diagnòstic, ja que aproximadament un 30 % de l'activitat relacionada amb la citometria de flux arreu del nostre entorn és «no clínica». En síntesi, aquests coneixements no han de ser només tecnològics, ja que han d'estar acompanyats d'una sòlida formació preferiblement en biologia cel·lular i molecular, immunologia i física i química. En cas contrari, es pot arribar a situacions massa freqüents en què investigador i operador es retreuen un a l'altre els resultats negatius aconseguits, sense adoptar les mesures correctores necessàries. Dit d'una altra manera, la citometria necessita treure's definitivament l'estigma de la seva «aparent simplicitat». El desconeixement envers la citometria fa que molt freqüentment es consideri que una persona amb una formació preliminar bàsica serà capaç de resoldre experiments de gran complexitat. Finalment, d'igual manera que una anàlisi complexa d'expressió gènica no es durà a terme sense el suport d'un bioinformàtic, els experiments, cada cop més complexos, de citometria, és necessari abordar-los amb l'assessoria i supervisió d'un citometrista.

Bibliografia

- BANDURA, D. R. [et al.] (2009). «Mass cytometry: technique for real time single cell multi-target immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry». *Anal Chem.*, 81 (16): 6813-6822.
- BAUMGARTHA, N. [et al.] (2000). «A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping». *J. Immunol. Methods.*, 243: 77-97.
- CROSLAND-TAYLOR, P. J. (1953). «A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube». *Nature*, 171: 37-38.
- FULWYLER, M. J. (1965). «Electronic separation of biological cells by volume». *Science*, 150 (3698): 910-911.
- GIVAN, A. L. (2001). *Flow cytometry: first principles*. Wiley-Liss.
- HULETT, H. R. [et al.] (1973). «Development and application of a rapid cell sorter». *Clin. Chem.*, 19 (8): 813-816.
- KAMENSKY, L. [et al.] (1965). «Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis». *Science*, 150: 630-631.
- LEE, J. A. [et al.] (2008). «MIFlowCyt: the minimum information about a flow cytometry experiment». *Cytometry A.*, 73 (10): 926-930.
- LEEUWENHOECK, A. P. van (1720). «Observations of the muscular fibers of fish». *Phil. Trans.*, 31: 190-199.
- LUGLI, E. [et al.] (2007). «Subject classification obtained by cluster analysis and principal component analysis applied to flow cytometric data». *Cytometry A.*, 71 (5): 334-344.
- MELAMED, M. R. [et al.] (1990). *Flow cytometry and sorting*. Wiley-Liss.
- MOLDAVAN, A. (1934). «Photo-electric technique for the counting of microscopical cells». *Science*, 24: 188-189.
- PERFETTO, S. P. [et al.] (2004). «Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system». *Nat. Rev. Immunol.*, 4 (8): 648-655.
- PETRAUSCH, U. [et al.] (2006). «Polychromatic flow cytometry: a rapid method for the reduction and analysis of complex multiparameter data». *Cytometry A.*, 69 (12): 1162-1173.
- ROBINSON, J. P. [et al.] (2012). *Current protocols in cytometry*. John Wiley & Sons.
- ROEDERER, M. (2002). «Compensation in flow cytometry». *Curr. Protoc. Cytom.*, cap. 1, unitat 1.14.
- ROSA, S. C. de [et al.] (2001). «11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity». *Nat. Med.*, 7 (2): 245-248.
- SHAPIRO, H. M. (2003). *Practical flow cytometry*. Wiley-Liss.
- STRUTT, J. W. (1879). «On the capillary phenomena of jets». *Proc. R. Soc. London*, 29: 71-97.
- SWEET, R. G. (1965). «High frequency recording with electrostatically deflected ink jets». *Rev. Sci. Instr.*, 36 (2): 131-136.
- TAYLOR, C. F. [et al.] (2008). «Promoting coherent minimum reporting guidelines for biological and biomedical investigations: the MIBBI project». *Nat. Biotech.*, 26: 889-896.