

INSTITUTO ANTOFAGASTA

LABORATORIO DE CITOMETRIA DE FLUJO "CLASIFICADOR DE CELULAS ACTIVADO POR FLUORESCENCIA – CITOMETRO DE FLUJO BD FASCJazz".

HISTORIA DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

1934. El primer esbozo del Citómetro de Flujo se puede inferir del trabajo de Andrew Moldavan ("Photo-electric technique for the counting of microscopical cells". A. Moldavan. Science 80:188-189; 1934). El autor muestra cómo contar los glóbulos rojos a través de un tubo capilar valiéndose de un sensor fotoeléctrico y así introduce el concepto de "contar células". Según los historiadores, esa publicación **contiene la simiente del Citómetro de Flujo.**

1949. En los años 40 ya se contaban bacterias en aerosoles, siendo impulsado como consecuencia de los conflictos bélicos de esa época y en la década del 50, se diseñaron instrumentos para contar las poblaciones celulares sanguíneas, **en un flujo líquido, diferenciando el tamaño celular (contadores hematológicos)**. Para ello se basaron en el método de impedancia eléctrica: Cada célula que atraviesa "el orificio" (orificio coulter) produce cambios en la resistencia y genera un pulso eléctrico. **El número de pulsos** equivale al número de partículas (células en líquido) y la **amplitud del pulso** es proporcional al volumen (tamaño). Los equipos fueron rápidamente incorporados en los laboratorios clínicos ("High Speed Automatic Blood Cell Counter and Cell Size Analyzer Wallace H, Coulter". H. Coulter, Coulter Electronics, Chicago, Illinois. Proc.Natl.Electronics Conf.12:1034-1042, 1956).

1953. Crosland y Taylor, diseñaron luego un aparato en el que introdujeron una corriente de **flujo laminar** con un **enfocado hidrodinámico**. De esta manera, resuelven las dificultades encontradas por Moldavan para mantener la estabilidad en el flujo y permitir que las células pasen **una a una** por el área de registro ("A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube". P.J., Crosland & Taylor Bland-Sutton. Institute of Pathology Middlesex Hospital. London. W.1. June 17, 1952 Nature 171:37-38, 1953). La mirada retrospectiva de cómo se llega al Citómetro de Flujo pone en evidencia, una vez más, la importancia del trabajo multidisciplinario.

Fueron muchos los años que pasaron desde los primeros estudios del movimiento de una partícula en un medio líquido y relativamente muy pocos años los que permitieron alcanzar el diseño comercial, esto quiere decir la fabricación de un equipo cerrado. Los investigadores utilizaban los Citómetros de Flujo y hacían variaciones necesarias según el trabajo que requerían. Para la comercialización sin embargo era necesario definir un equipo con estructura fija. Se requirió del aporte desde el área de la física, la hidrodinámica, la óptica, la informática, las investigaciones en biología, en química y muy especialmente en el área de la inmunología, entre otros.

1965. Kamensky y col., introdujeron al sistema de flujo un espectrofotómetro que captaba emisiones en el UV para determinar el contenido de DNA. Además idearon un "sistema computarizado" para registrar las mediciones mediante gráficos. ("New

instrument for ultrarapid cell analysis". Spectrophotometer. L.A Kametsky, M.R Melamed & H. Derman, Science 150, 1965).

1968. La empresa Becton Dickinson había producido un analizador de mesa, el FACScan equipado con una computadora construída por Hewlett-Packard (Palo Alto-CA). Pocos años después el sistema informático fue reemplazado por Macintosh-Apple (Cupertino,CA). La lámpara de ARCO fue una de las primeras fuentes de Luz empleadas en el Citómetro de Flujo. La luz monocromática, que es seleccionada por el operador de acuerdo a lo que corresponda utilizar, excita a las células que fueron previamente marcadas con un determinado fluorocromo. La luz emitida es medida y en consecuencia es cuantificable.

Dittrich y Gohde, utilizaron como fuente de luz una lámpara de arco y por primera vez miden la fluorescencia emitida por las partículas suspendidas en un flujo líquido. Se pudo estudiar más de una característica de la célula al emplear más de un fluorocromo y se introdujeron otras fuentes de luz.

1973 – 1975. Shapiro H.M. *et al.*, diseñan Citómetros con varias fuentes de excitación simultánea (multibeam).

N.K. Jerne (Dinamarca), Georges J.F. Kohler (Alemania) y C. Milstein (Argentina) – Premio Nobel 1984; desarrollaron la técnica para crear anticuerpos con idéntica estructura química que se conocieron como los **anticuerpos monoclonales**. Son anticuerpos homogéneos producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral. Todos los clones proceden de una sola célula madre y los anticuerpos monoclonales reconocen específicamente "un antígeno". Cuando uno ya ha utilizado, en sus experimentos, un anticuerpo monoclonal y debe reponerlo es importante consultar y/o corroborar que el que va a comprar provenga del mismo clon.

Los investigadores cedieron absolutamente todo el fruto del descubrimiento, así como la técnica para producirlos. Hoy los estudios en Citometría de Flujo, en el campo de las Ciencias Médicas están íntimamente relacionados con el área de la inmunología. Los anticuerpos monoclonales se conjugaron con fluorocromos y fue posible diferenciar poblaciones celulares y cuantificarlas. Su empleo permitió, como lo mencionamos ya, diferenciar células B, T (con sus subpoblaciones), monocitos, polimorfonucleares (eosinófilos, basófilos, neutrófilos), y por la expresión de los receptores de membrana fue posible detectar células aberrantes en sangre entera, sin requerir un proceso de purificación. Se abrió así el camino para el diagnóstico de células tumorales.

1980. Comienza la demanda de los Citómetros de Flujo de mesa por la emergencia del VIH-SIDA. Hasta entonces los marcadores de células B y de T -ayudadoras y citotóxicas- (CD3+CD4+ y CD3+CD8+ respectivamente) se realizaba empleando la microscopía (Citometría Estática).

La Citometría de Flujo, es una técnica de análisis que se difundió rápidamente ya que se utiliza para medir múltiples parámetros en una sola célula, permitiendo caracterizar poblaciones celulares que cumplen funciones específicas en un proceso biológico. Junto a la citometría de flujo se desarrolló la tecnología para separar células vivas en base a los parámetros medidos por el citómetro de flujo. Esto, constituye una poderosa herramienta para el estudio de diversas poblaciones celulares y está disponible en el mercado hace más de 20 años.

Referencias Bibliográficas:

Sitios Web sugeridos:

<http://www.practicalflowcytometry.com> (Howard M. Shapiro).

<http://www.neoteo.com/el-rayo-laser>

<http://herramientas.educa.madrid.org/tabla/espectros/spespectro.html>

Publicaciones:

The Evolution of Cytometers. Shapiro Howard M. Cytometry Part A 58A:13-20, 2004.

Review Article: "Cellular Astronomy" – A foreseeable Future in Cytometry. Shapiro Howard M. Cytometry Part A 60A:115-124, 2004.

Personal Cytometers: Slow Flow or No Flow?. Shapiro Howard M. Cytometry Part A 69A:620-630, 2006.