



# Citometría de flujo como herramienta biotecnológica

## Flow cytometry as a biotechnological tool

SORIUSKA J MAYORA H

### Resumen

La citometría de flujo (CMF) es una técnica analítica en la cual las partículas que se encuentran en suspensión pasan de una en una frente a una fuente de luz, típicamente un haz de luz láser. Esto genera cambios en la dispersión de la luz, lo cual se traduce digitalmente a través de un sistema electrónico para brindar información sobre las características de tamaño y complejidad de la partícula analizada. La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia y los parámetros medibles pueden ser intra o extracelulares, para ellos se emplean marcadores fluorescentes y se requiere que las células sean teñidas previo a su análisis. En Venezuela la citometría de flujo ha sido una herramienta utilizada para la evaluación de posibles agentes farmacológicos en distintas patologías como cáncer e inflamación e internacionalmente se ha empleado para la evaluación de cultivos bacterianos y fúngicos además otras múltiples aplicaciones. En este trabajo se describirán algunos de los procesos biotecnológicos en los que la citometría de flujo ha sido empleada y generados aportes significativos a lo largo de las últimas décadas.

**Palabras clave:** Citometría de flujo, biotecnología, aplicaciones

### Abstract

Flow cytometry (FCM) is an analytical technique in which suspended particles are passed one at a time in front of a light source, typically a laser beam. This generates changes in light scattering, which is digitally translated through an electronic system to provide information on the size and complexity characteristics of the analyzed particle. Most of the applications of flow cytometry are based on fluorescence monitoring and the measurable parameters can be intra or extracellular, for which there are used fluorescent markers, and the cells are required to be stained before analysis. In Venezuela, flow cytometry has been used as a tool for the evaluation of possible pharmacological agents in different pathologies such as cancer and inflammation, and internationally it has been used for the evaluation of bacterial and fungal cultures, as well as other multiple applications. This paper will describe some of the biotechnological processes in which flow cytometry has been used and made significant contributions over the last decades.

**Keywords:** Flow cytometry, biotechnology, applications

---

Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, UCV. Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C"  
Correspondencia: sori\_mayo@hotmail.com. Orcid: [0000-0002-7194-7264](https://orcid.org/0000-0002-7194-7264)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.5)

Disponible: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ff](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff)

Recepción: 31/03/2022

Aprobación: 17/04/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 00-00. 2022

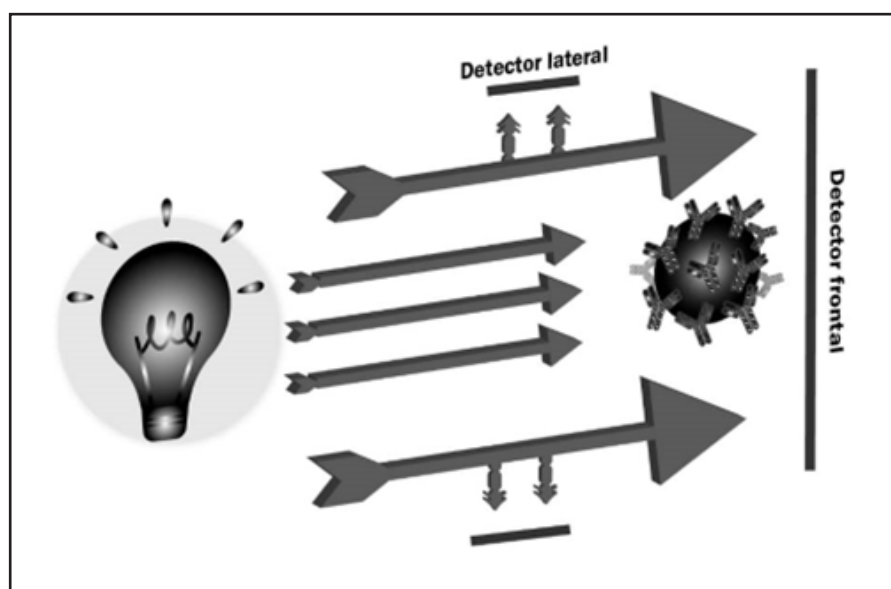
## Introducción

La citometría de flujo (CMF) es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la ingeniería de proteínas. Constituye una técnica analítica en la cual las partículas suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser. Esto genera cambios en la dispersión de la luz, lo cual se traduce digitalmente a través de un sistema electrónico para brindar información sobre las características de tamaño y complejidad de la partícula analizada (Figura 1).

Una segunda fuente de información proviene del uso de compuestos fluorescentes que pueden estar ligados a anticuerpos específicos contra la partícula a analizar, elementos cuya estructura química sea capaz de emitir fluorescencia al sufrir algún tipo de cambio en su composición o elementos de unión a ácidos nucleicos.

La mayoría de las aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo de la fluorescencia y los parámetros medibles pueden ser intra o extracelulares, para ello se emplean marcadores fluorescentes y se requiere que previamente al análisis las células sean teñidas. Es de esta manera que se pueden evaluar un sin número de características celulares, no solo de forma fenotípica, sino también funcional, lo cual representa una gran ventaja de esta técnica sobre otras, y lo cual genera como resultado que sea una herramienta que ha ganado un gran terreno en el campo de la evaluación y optimización de los procesos biotecnológicos.

Siendo una técnica bien establecida, la citometría de flujo es capaz de proveer información sobre los cultivos a nivel de cada célula a través del análisis de múltiples parámetros extrínsecos o intrínsecos. Los resultados de esta tecnología permiten expandir las posibilidades en el control de bioprocesos y operaciones industriales (Cossarizza y col., 2017).



**Figura 1.** Ilustración del fenómeno de dispersión de luz frontal y lateral en un citómetro de flujo convencional. La dispersión lateral es captada por un detector y traducida para brindar información sobre la complejidad de la partícula analizada, mientras que la dispersión frontal indica su tamaño.

En Venezuela la citometría de flujo ha sido una herramienta utilizada para la evaluación de posibles agentes farmacológicos en distintas patologías como cáncer e inflamación e internacionalmente se ha empleado para la evaluación de cultivos bacterianos y fúngicos, además otras múltiples aplicaciones

En este trabajo se describirán algunos de los procesos biotecnológicos en los que la citometría de flujo ha sido empleada y realizados aportes significativos a lo largo de las últimas décadas.

### **Aplicaciones de la Citometría de Flujo en el Campo Biotecnológico**

El ingeniero agrónomo húngaro Karl Ereky (1919) acuñó el término biotecnología para describir la fusión de la biología con la tecnología. Consiste en que la ciencia y los métodos aplicados a la biología podría utilizarse para convertir las materias primas en productos útiles a partir de organismos vivos. La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que emplea diferentes disciplinas como la biología, química, farmacia y medicina. Se utilizan sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados con el fin de crear o modificar diversos productos o procesos para usos concretos. La creciente lista de productos biotecnológicos incluye medicamentos, dispositivos médicos y diagnósticos, así como cosechas más resistentes, biocombustibles, biomateriales y controles de la contaminación. Por lo que esta ciencia puede ser dividida en muchas ramas que van desde sus aplicaciones médicas hasta las aplicaciones ambientales e industriales. Es por lo que muchos de los procesos se basan en el establecimiento y mantenimiento de cultivos

de microorganismos principalmente de tipo fúngico y bacteriano. La concentración de células viables en un cultivo es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de bioprocesos, aunque existen gran cantidad de métodos para determinar la viabilidad, el usado más comúnmente es el análisis de la integridad de la membrana, defectos en su estructura ocasionan cambios en la permeabilidad celular permitiendo la salida de material intracelular, lo que finalmente puede generar la muerte celular (Rieseber y col., 2021).

Otro de los ensayos más frecuentes es el análisis del ciclo celular, este ensayo es importante para estudiar el crecimiento celular, la senescencia y la apoptosis, lo cual permite investigar mecanismos esenciales, así como evaluar la eficacia de drogas terapéuticas (Kim y Sederstrom, 2015) y métodos de ingeniería genética. Geisinger y Stearns (2021) describen un método basado en citometría de flujo que permite determinar la progresión del ciclo celular en presencia del tratamiento con CRISPR/Cas9, una técnica poderosa utilizada para la edición e ingeniería del genoma.

Aunque resulte innegable que el uso de la citometría de flujo en el campo de la biotecnología aún no ha sido aprovechado a su máximo potencial, sobre todo en los países en vías de desarrollo, es importante destacar los diferentes espacios dentro de esta ciencia en los que la técnica ha demostrado tener importantes aplicaciones.

### **CMF Y ESTUDIO BACTERIANO**

Los métodos convencionales de la microbiología, aunque efectivos son relativamente lentos en comparación a otras técnicas más novedosas, esto se

debe a la necesidad de realizar cultivos los cuales pueden tardar días o semanas para generar resultados. La citometría de flujo permite el análisis múltiple o individual de microorganismos de forma rápida y confiable.

La aplicación de ensayos basados en citometría de flujo permite estudiar como las bacterias presentes en una suspensión ya sea heterogénea u homogénea reaccionan ante la variación en condiciones como temperatura, ausencia o presencia de nutrientes o agentes terapéuticos como los antibióticos.

La detección temprana de la resistencia a los medicamentos contribuye a combatir las bacterias resistentes a los medicamentos y a mejorar los resultados de los pacientes. Para ello, Sawada y col. (2021), validaron la viabilidad del recuento directo de bacterias mediante citometría de flujo cuantitativa de alta sensibilidad mediante el uso de tinción con el fluoróforos SYTO 9 para determinar la resistencia de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a drogas como penicilina y cefotaxime, concluyendo que la citometría de flujo La citometría de flujo cuantitativa de alta sensibilidad presenta una nueva vía para realizar pruebas rápidas de susceptibilidad a los antimicrobianos. De forma similar algunos productos de la industria alimenticia que utilizan organismos bacterianos para su fabricación han recurrido a la citometría flujo para la evaluación rápida de sus procesos, así como la optimización de los mimos. Este es el caso de Chiron y col. (2018), aplicaron ensayos de citometría de flujo para la cuantificación y evaluación de viabilidad de microorganismos en productos probióticos combinando la tinción con dos fluoróforos como lo son el SYTO9 y el yoduro de propidio, encontrando

que con esta tecnología se lograba una cuantificación más rápida comparado con el método clásico. Malacrinò y col., tiñeron bacterias malolácticas y hongos presentes en muestras de medio de cultivo y vino para estudiar su viabilidad a través del uso de distintos marcadores fluorescentes, los investigadores concluyen que la citometría de flujo debe considerarse como una herramienta de valor en el control de calidad microbiológico en los viñedos y para la investigación de la dinámica de crecimiento de microorganismos en los vinos. Gunasekera y col. (2000) desarrollaron un método basado en citometría de flujo para la rápida determinación de la cantidad total de bacterias presentes en muestras de leche utilizando SYTO BC, que es una tinción de ácido nucleico de alta afinidad que penetra tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas, dando una señal fluorescente verde brillante.

### **CMF, LEVADURAS Y HONGOS**

La citometría de flujo ha sido extensamente utilizada para monitorear distintas propiedades de las levaduras. La levadura más estudiada bajo esta técnica ha sido *Saccharomyces cerevisiae* debido a su importante papel en la industria de alimentos y sus múltiples usos en variedad de productos biotecnológicos. El pH intracelular tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones normales de las células de levadura. La capacidad de la célula para mantener esta homeostasis del pH también en respuesta a los cambios ambientales ha ganado cada vez más interés tanto en la investigación básica como en la aplicada. Al respecto, Valli y col. (2017) describen un protocolo que permite la determinación rápida del pH intracelular de las células de *Saccharomyces cerevisiae*. El método se basa en la citometría de flujo

y emplea la sonda fluorescente carboxi SNARF-4F dependiente del pH.

Un parámetro importante en los biorreactores con cultivos filamentosos es la morfología del hongo, dependiendo del objeto deseado para el bioproceso pueden existir características favorables que deben ser cuantificadas. Uno de los organismos más estudiados se refiere al hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum*, el cual tiene un gran número de aplicaciones biotecnológicas como la penicilina. Veiter y Herwing (2019) desarrollaron un método basado en la citometría de flujo que emplea tinción fluorescente el cual permitió evaluar la compleja relación entre la morfología, la viabilidad y la productividad de los hongos, tanto en el desarrollo de procesos como en los procesos de manufactura de rutina. Ehgartner y col. (2017) en su estudio comparativo presentan un método de citometría de flujo para el análisis morfológico como una alternativa rápida y confiable, como una vía alternativa a las herramientas comunes como la microscopía.

#### **CMF EN EL ESTUDIO DE AGENTES FARMACOLÓGICOS**

La industria farmacológica evoluciona a medida que la especie humana enfrenta nuevos retos, se necesitan cada vez procedimientos más rápidos y eficientes que permitan evaluar de forma segura diferentes candidatos a agentes terapéuticos. Es en este campo en particular donde la CMF, junto al uso de los cultivos celulares ha logrado una gran contribución al campo a lo largo de los años. Diferentes grupos de investigación, a nivel nacional e internacional, han recurrido a la citometría de flujo para evaluar la acción antitumoral o antiinflamatoria de diversos compuestos

orgánicos. Así, Daddiouaissa y col. (2019) describieron los efectos antiproliferativos *in vitro* y los eventos apoptóticos del extracto líquido iónico de la fruta de Graviola (IL-GFE) en células de cáncer de mama MCF-7 y su comportamiento citocinético para observar su potencial como alternativa terapéutica en el tratamiento del cáncer. Para observar los efectos del extracto de fruta de Graviola emplearon el ensayo de viabilidad celular del extracto, mediante el uso de bromuro de tetrazolio (ensayo MTT) y la distribución del ciclo celular y el mecanismo de apoptosis de la acción de IL-GFE en células cancerosas MCF-7 la observaron mediante citometría de flujo. Así demostraron que el IL-GFE fue capaz de afectar el comportamiento citocinético de las células MCF-7 al reducir la viabilidad celular, inducir la apoptosis y la detener el ciclo celular en la fase G0/G1. De forma similar, Cardullo y col. (2020) sobre las líneas celulares HCT116, HT-29 y PC3, utilizaron el ensayo de apoptosis con anexina V, con el fin de determinar el efecto de los compuestos bisfenol inspirados en honokiol, este último un neolignano natural que muestra una variedad de propiedades biológicas, incluida la actividad antitumoral. Los experimentos de citometría de flujo realizados con estos neolignanos mostraron que la inhibición de la proliferación se debe principalmente a un proceso apoptótico.

En Venezuela, Ramírez y col. (2021) destacan la acción antimalárica y anticancerígena *in vitro* de compuestos sintéticos derivados de 7-cloroquinolonas al evaluar la viabilidad, ciclo celular e inducción de la apoptosis sobre las líneas celulares MCF-7 humana y A549. El efecto de los derivados 6 y 12 de la 7-cloroquinolina sobre la apoptosis y la necrosis de la línea celular MCF-7 humana, fue evaluado por citometría de flujo demostrándose que

estos derivados fueron más activos contra las células MCF-7, evidenciado por su efecto anti-proliferativo y proapoptótico.

La nanotecnología, mediante el uso de nanopartículas de oro, puede servir para tratar con más eficacia algunos tumores cancerígenos, ya que las nanopartículas de oro aumentan el efecto de la radioterapia al reducir la toxicidad de la quimioterapia y aumentar la eficacia de la radioterapia. Así, utilizando la CMF para sus estudios en terapias antineoplásicas, Yun y col. (2020) midieron el efecto de las nanopartículas de oro en líneas celulares de cáncer gástrico humano demostrando un efecto mediante la modulación de mediadores pro-apoptóticos como la caspasa-3, Bax, Bid, y la caspasa-9 y anti-apoptóticos como el Bcl-2 y el Bcl-XL. Igualmente, Daei y col. (2021), abordaron las células de cáncer de vejiga demostrando que las nanopartículas de oro inducen un aumento significativo de la producción de especies reactivas de oxígeno, inducen la apoptosis y suprimen la migración celular en las células 5637 del cáncer de vejiga. Ambos combinaron sus estudios con las nanopartículas de oro y métodos basados en la técnica de citometría de flujo.

## Conclusiones

Después de esta breve panorámica sobre las aplicaciones de la citometría de flujo, queda claro que esta técnica tiene mucho que ofrecer al campo de la biotecnología, su implementación en las diferentes industrias de productos biotecnológicos demuestra que se trata de una herramienta aprovechable que, en un futuro próximo, y en conjunto a otros avances tecnológicos podría convertirse en parte fundamental en el desarrollo y optimización de bioprocesos.

## Referencias Bibliográficas

- Cardullo N, Barresi V, Muccilli V, Spampinato G, D'Amico M, Condorelli DF, Corrado T. 2020. Synthesis of bisphenol neolignans inspired by honokiol as antiproliferative agents. *Molecules* 25(3):733.
- Chiron C, Tompkins TA, Burguière P. 2018. Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of microorganisms in multistrain probiotic products. *J Appl Microbiol* 124(2):572-584.
- Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, André I, Annunziato F, et al. 2017. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*, 47(10), 1584-1797.
- Daddiouaissa D, Amid A, Kabbashi N, Fazia F, Elnour A, Epandy M. 2019. Antiproliferative activity of ionic liquid-graviola fruit extract against human breast cancer (MCF-7) cell lines using flow cytometry techniques. *J Ethnopharmacol* 23; 236:466-473.
- Daei S, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Khanaki K, Bahreini F. 2021. Anti-cancer Effects of Gold Nanoparticles by Inducing Apoptosis in Bladder Cancer 5637 Cells. *Biol Trace Elem Res* doi: 10.1007/s12011-021-02895-9.
- Díaz M. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Engineeri J* 48: 385-407.
- Ehgartner D, Herwig C, Fricke J. 2017. Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry-the fast alternative to microscopic image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(20):7675-7688.
- Geisinger JM, Stearns T. 2021. Assaying cell cycle progression via flow cytometry in CRISPR/Cas9-treated cells. *Methods Mol Biol* 2329:195-204.
- Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. 2000. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl Environ Microbiol* 66(3):1228-1232.
- Kim KH, Sederstrom JM. 2015. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* 111:28.6.1-28.6.11.
- Lloyd D. 2001. Flow Cytometry of Yeasts. *Curr Protoc Cytom Chapter 11: Unit 11.10.*
- Malacrino P, Zapparoli G, Torriani S, Dellaglio F. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 45(2):127-34.

- Manohar SM, Shah P, Nair A. 2021. Flow cytometry: principles, applications, and recent advances. *Bioanalysis* 13(3):181-198.
- Ramírez H, Fernández E, Rodrigues J, Mayora S, Martínez G, Celis C, De Sanctis JB, Mijares JM, Charris J. 2021. Synthesis and antimalarial and anti-cancer evaluation of 7-chloroquinoline-4-thiazoleacetic derivatives containing aryl hydrazide moieties. *Arch Pharm (Weinheim)* 354(7): e2100002.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:350-360.
- Sajede D, Ziamajidi N, Abbasalipourkibir R, Khanaki K, Bahreini F. 2021. Anticancer effects of gold nanoparticles by inducing apoptosis in bladder cancer 5637 cells. *Biol Trace Elem Res* 28. doi: 10.1007/s12011-021-02895-9.
- Sawada T, Katayama M, Takatani S, Ohiro Y. 2021. Early detection of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by quantitative flow cytometry. *Sci Rep* 11(1):2873.
- Schmid RD, Schmidt-Dannert C, Hammelehle R. 2016. *Biotechnology an Illustrated primer*. Wiley-Blackwell ISBN: 978-3-527-33515-2.
- Valli M, Sauer M, Branduardi P, Borth N, Porro D, Mattanovich D. 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 71(3):1515-21.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods* 243(1-2):191-210.
- Veiter L, Herwing C. 2019. The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry-a fast and statistically sound insight into morphology and viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(16):6725-6735.
- Yun Z, Chinnathambi A, Alharbi SA, Jin Z. 2020. Biosynthesis of gold nano-particles using *Vetex negundo* and evaluation of pro-apoptotic effect on human gastric cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B* 203:111749.