



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO, BASES DEL
DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS SUPERVISADO**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Rosario Hernández González

CDMX

AÑO 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarria
VOCAL:	Profesor: Enrique Ortega Soto
SECRETARIO:	Profesor: Heriberto García Prado
1er. SUPLENTE:	Profesor: Gibrán Pérez Montesinos
2° SUPLENTE:	Profesor: Ismael Mancilla Herrera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ONCO-INMUNOBIOLOGÍA, INTITUTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

HERIBERTO PRADO GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

SUSTENTANTE (S):

ROSARIO HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo y cariño incondicional durante todo este tiempo.

Al Dr. Heriberto Prado García por su mentarías y enseñarme sobre este tema que tanto me ha apasionado. Gracias por compartir su conocimiento y su disposición para terminar este proyecto.

A mi hermana Alejandra por todo el apoyo que me ha brindado y ser un ejemplo profesional y como persona.

A mi amiga Isabel por compartir tantos años de amistad que han sido un gran apoyo durante mi vida

A mis padres Felipe e Irene por impulsarme a continuar estudiando y siempre dispuestos a apoyar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente

Contenido

Introducción	1
Objetivo.....	2
Principios de la citometría de flujo	2
Sistemas que componen la citometría de flujo.....	4
1) Sistema de flujo	4
2) Sistema óptico	5
3) Sistema electrónico	8
Fluorescencia	10
-Principio de fluorescencia	11
Tipos de fluorocromos utilizados en citometría de flujo	12
a) Unión a anticuerpos, proteínas o ligandos	14
b) Unión a ácidos nucleicos.....	15
c) Moléculas reporteras	15
Información que proporciona la citometría de flujo	17
a) Un parámetro: histogramas.....	17
b) Dos parámetros: gráfico de puntos, contorno y densidad	18
Requerimientos básicos para un ensayo de citometría de flujo	20
-Preparación de la muestra	21
-Marcaje	22
-Creación de panel y compensación.....	23
1) Configuración del citómetro de flujo:.....	23
2) Elección de marcadores	24
3) Prueba y optimización	24
4) Uso y compensación	25

-Controles.....	26
Controles de citometría.....	27
Controles biológicos.....	29
Análisis supervisado de citometría de flujo	30
a) Gate de tiempo	32
b) Gate de células individuales	34
c) Gate de viabilidad.....	35
d) Gate de tamaño y granularidad	36
e) Gate de poblaciones específicas.....	37
Ejemplo de análisis supervisado: Medición de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	38
-Flujo	41
-Células individuales.....	42
-Población de estudio	42
-Subpoblaciones	42
Discusión	44
Conclusiones	48
Referencias.....	48

Introducción

La citometría de flujo es una tecnología que permite el análisis individual de una gran cantidad de células o partículas en un breve periodo de tiempo, haciendo posible el estudio de diversos fenómenos biológicos. Se compone de los sistemas de fluidos, óptico y electrónico. Para su funcionamiento, las células son transportadas en suspensión a través del citómetro de flujo; al ser incididas por la fuente de luz se genera el fenómeno de dispersión de luz y emisión de fluorescencia. La dispersión de la luz proporciona información sobre el tamaño y la complejidad de las células en una población heterogénea. Por otro lado, con el uso de moléculas fluorescentes es posible la identificación y cuantificación de diferentes parámetros en las células o partículas de estudio (McKinnon, 2018).

La citometría de flujo tiene diversas aplicaciones en el campo de la biología como el estudio de los mecanismos de muerte celular, los perfiles de inmunofenotipificación, el ciclo celular, la proliferación celular, las tinciones intracelulares, la evaluación de moléculas solubles y los ensayos de citotoxicidad; En el área clínica, mediante la detección de marcadores de fenotipificación, la citometría de flujo se ha utilizado en el diagnóstico clínico de algunas inmunodeficiencias, leucemias, infección por VIH, monitoreo de un trasplante, entre otras (Chantzoura & Kaji, 2017; Flores-Gonzalez et al., 2020).

La citometría se encuentra avanzando en el desarrollo de reactivos y herramientas de análisis de datos lo que lleva a un mejor estudio de las funciones biológicas de interés en condiciones normales o patológicas (Lugli et al., 2010). En el campo de la instrumentación, estos avances han permitido realizar variaciones a la citometría tradicional como la citometría espectral, la citometría de imagen y la citometría de masas (McKinnon, 2018).

Un ensayo de citometría de flujo comprende las fases pre-analíticas, analíticas y post-analíticas, que abarcan desde la preparación de la muestra y diseño del experimento hasta la adquisición de las muestras en el citómetro pertinente; con el fin de su posterior análisis y adquisición de la información necesaria con el uso de softwares especializados para la citometría de flujo (Flores-Gonzalez et al., 2020).

El análisis de datos se facilita si se tiene conocimiento de los fundamentos en los cuales se basa la citometría. Uno de los métodos de análisis más utilizados es el *gating* secuencial o análisis supervisado, el cual consiste en ir seleccionando de manera manual y secuenciada áreas de las gráficas que pueden ser utilizadas para definir características de las partículas para análisis posteriores (Adan et al., 2017).

Objetivo

Realizar un escrito que abarque los principios y generalidades de la citometría de flujo, los aspectos importantes para el desarrollo de un ensayo de citometría y la generación de un análisis supervisado con el fin de ser una guía en español para los que se inicien en la utilización de la técnica.

Principios de la citometría de flujo

Las bases para el desarrollo de la citometría de flujo se relacionan con los avances en la microscopía, los métodos de tinción celular, la electrónica y la tecnología computacional. El primer prototipo de un citómetro fue realizado por Andrew Moldavan en 1934; sin embargo, fue hasta 1968 que Wolfgang Göhde y colaboradores desarrollaron el primer citómetro de flujo que se basó en la fluorescencia (Chantzoura & Kaji, 2017; Givan, 2011). A partir de entonces la citometría de flujo se encuentra en constante innovación; no obstante, su principio continúa siendo el mismo.

La citometría de flujo se basa en el movimiento de las partículas en suspensión que atraviesan una fuente de luz, dando como resultado la dispersión de la luz y emisión de fluorescencia. Una partícula se refiere como término general a cualquier cuerpo que fluye a través del citómetro de flujo y puede ser de distinta naturaleza, como un microorganismo, célula, núcleo, microvesículas o nanopartículas. (Adan et al., 2017; Givan, 2011). A pesar de que el término partícula es más correcto de utilizar en relación a esta técnica, es común encontrar información sobre la citometría de flujo que solo se refiere a las células al ser lo más estudiado.

El fenómeno de dispersión de luz se relaciona con las propiedades estructurales de la célula, mientras que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de la molécula fluorescente que está presente en la célula o partícula (Adan et al., 2017).

Un citómetro se compone de tres sistemas: fluidos, óptico y electrónico (Fig. 1). Cada uno será descrito con más detalle en los siguientes capítulos, pero de forma general el funcionamiento de los sistemas en conjunto es el siguiente: Las células se transportan por un flujo de líquido (sistema de fluidos) a través del equipo y hacia el punto de interrogación en el cual entran en contacto con el láser, generando la dispersión de la luz y emisión de fluorescencia. La luz y fluorescencia son recolectadas por una serie de filtros y detectores determinados (sistema óptico), para posteriormente transformar la señal luminosa a una señal eléctrica (sistema electrónico) que permita su representación y posterior análisis (Chantzoura & Kaji, 2017).

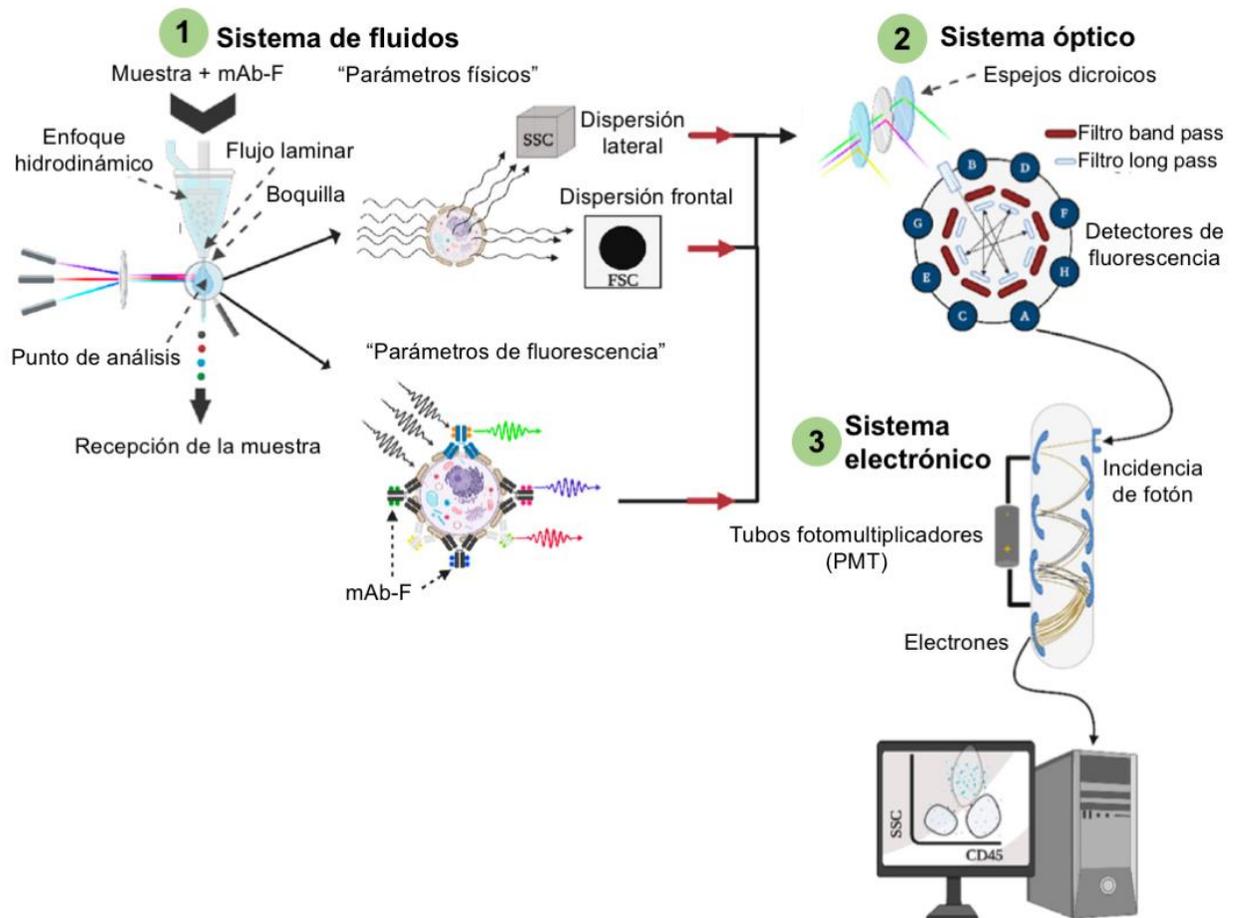


Fig. 1. Representación de los sistemas de componen el citómetro de flujo con algunos de sus componentes. 1) Sistema de fluidos, 2) Sistema óptico constituido por los láseres que excitan a las células y los filtros y espejos que captan las señales. 3) Sistema electrónico con detectores que transforman y amplifican las señales y permiten su visualización en computadora. Imagen modificada de Flores-Gonzalez et al., 2020.

Sistemas que componen la citometría de flujo

1) Sistema de flujo

Para medir las propiedades ópticas de las células en un citómetro de flujo, las células deben pasar a través de la zona de intersección del láser (punto de análisis). El sistema de fluidos tiene como finalidad transportar a las células de manera individual en una corriente líquida hacia el punto de interrogación; de manera que cada célula sea iluminada por el láser durante un tiempo breve y definido (Cossarizza et al., 2019; Givan, 2011).

El flujo de células individuales a través del citómetro se logra por un proceso conocido como enfoque hidrodinámico, que permite la alineación de las células y las obliga a pasar individualmente a través del rayo láser. El enfoque hidrodinámico ocurre en la cámara de flujo del citómetro donde las células en suspensión son inyectadas por un tubo delgado hacia el centro del fluido envolvente y por diferencias de presión, velocidad y densidad los fluidos no se mezclan (Fig. 2) (Cossarizza et al., 2019; Leach et al., 2013).

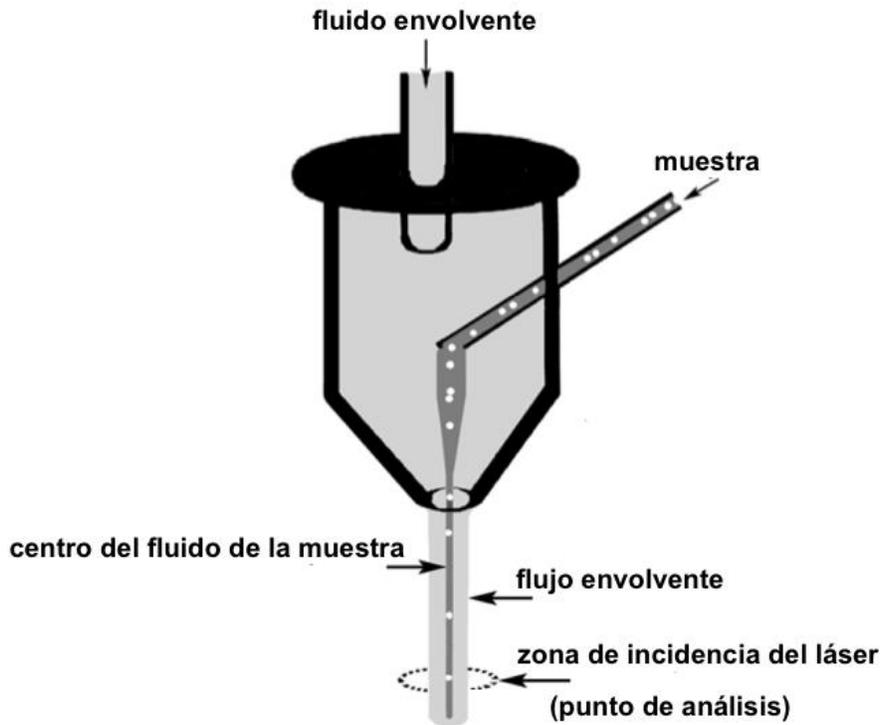


Fig. 2. Representación de la formación del flujo hidrodinámico tras la inyección de la muestra en el fluido envolvente. Las partículas pasan una tras otra por el punto de análisis. Imagen tomada de Givan, 2011.

Modificando la presión a la cual la muestra se adiciona al fluido envolvente se pueden hacer cambios en la amplitud del fluido y, en consecuencia, en el número de células que atraviesan el punto de análisis por lapso de tiempo. Con una mayor presión el flujo se vuelve más amplio y aumenta la frecuencia de células que pasan por el punto de interrogación; este tipo de flujo es útil en mediciones cualitativas como los ensayos de inmunofenotipificación. Utilizando una menor presión se tiene el efecto contrario y por lo tanto una menor frecuencia de células a través del láser, siendo esta situación más conveniente cuando se requiere alta resolución como es el caso en análisis de contenido de DNA (Adan et al., 2017; Leach et al., 2013).

2) Sistema óptico

El sistema óptico comprende la parte de la excitación mediante el uso de láseres con lentes para concentrar la luz y la recolección de la señal luminosa utilizando un

arreglo de lentes, filtros y espejos que se encargan de separar la luz y dirigirla hacia los detectores apropiados (Leach et al., 2013).

En citometría los láseres son muy utilizados ya que generan un haz de luz estrecho con una longitud de onda definida; actualmente la mayoría de los citómetros pueden utilizar láseres de gas (argón, kriptón, helio-neón) o de estado sólido (azul, diodo rojo, diodo violeta). Con ayuda de lentes convexos se enfoca la luz del láser hacia el punto de análisis (Cossarizza et al., 2019; Givan, 2011).

Cuando la célula pasa por el punto de análisis y es iluminada por el láser se genera el fenómeno de dispersión de la luz en dos direcciones; una en el mismo ángulo o en ángulos muy cercanos que el láser conocida como luz dispersa hacia delante (FSC por sus siglas en inglés de *Forward Scatter*) y que es proporcional al tamaño de la célula. La segunda dispersión se genera aproximadamente a 90° del punto de análisis por efecto de la reflexión y refracción de la luz; este tipo de luz es conocida como luz dispersa lateral (SSC por sus siglas en inglés de *Side Scatter*) y es proporcional a la granularidad o complejidad interna de las células (Fig. 3). Las señales FSC y SSC proporcionan información física de las células por los cambios en la dirección de la luz y sin necesidad de realizar una tinción fluorescente. (Adan et al., 2017; Leach et al., 2013).

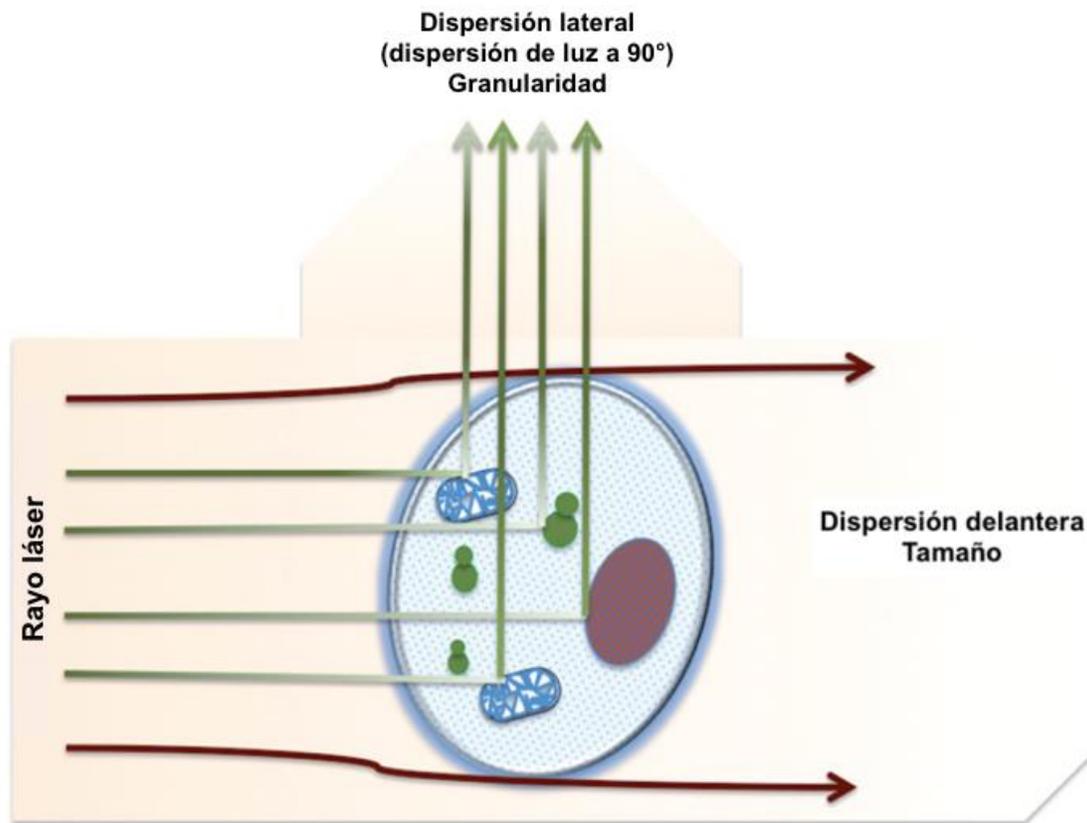


Fig. 3. Origen de las señales FSC y SSC de la célula tras la incidencia del láser. La señal de FSC (*Forward Scatter*) se obtiene en el mismo ángulo que incide el láser a la célula e indica el tamaño. SSC (*Side Scatter*) es detectada aproximadamente a 90° del láser y se relaciona con la complejidad y granularidad de las células. Imagen tomada de Adan et al., 2017.

Una señal muy importante a medir en la citometría de flujo es la emisión de fluorescencia la cual puede ser relacionada con propiedades bioquímicas específicas en las células. La detección de la luz fluorescente al igual que la señal SSC se detecta en un ángulo aproximado de 90°, con ayuda de filtros y espejos colocados de una manera predeterminada que permite el paso de ciertas longitudes de onda específicas a los detectores apropiados (Givan, 2011).

Existen tres tipos de filtros utilizados y son comúnmente conocidos por sus nombres en inglés: *bandpass* (BP), *longpass* (LP) y *shortpass* (SP). La característica común entre ellos es que sólo permiten el paso de la luz dentro cierto rango del espectro; los filtros BP transmiten un rango específico de longitud de onda, los filtros SP transmiten la luz con una longitud de onda menor o igual que la especificada en el

filtro y en el caso contrario, los filtros LP transmiten la luz con una longitud de onda mayor o igual que la indicada en el filtro (Fig. 4) (Leach et al., 2013).

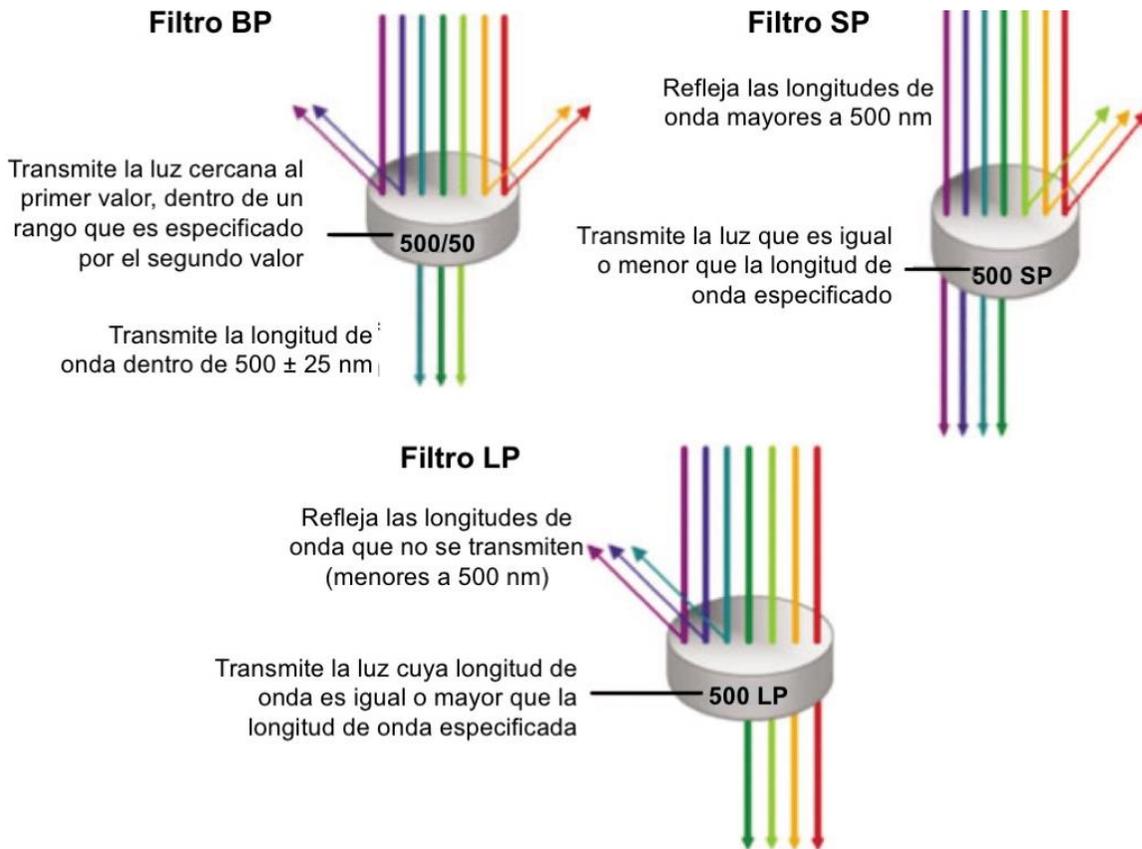


Fig. 4. Tipos de filtros usados en el sistema óptico de un citómetro de flujo. La imagen explica la diferencia entre los tres tipos de filtros usando como ejemplo la longitud de onda de 500 nm. Sin embargo, existen una gran cantidad de filtros para diferente longitud de onda. Imagen tomada de Leach et al., 2013.

Además de los filtros, dentro de la configuración óptica del citómetro se utilizan espejos dicroicos, los cuales se encargan de dividir el haz de luz para permitir el paso de cierta longitud de onda y reflejar el resto. Los espejos dicroicos direccionan la luz hacia un detector para cierta longitud de onda y al igual que los filtros las clases de espejos dicroicos se clasifican en LP y SP (Cossarizza et al., 2019; Longobardi, 2001).

3) Sistema electrónico

El sistema electrónico de un citómetro de flujo se encarga de convertir la señal luminosa en una señal eléctrica para su posterior análisis. La señal luminosa

generada por las células o partículas que pasan a través del punto de análisis es convertida a un voltaje por los fotodetectores. Existen dos tipos de detectores, los fotodiodos (PD, por sus siglas en inglés de *photodiode*) y los tubos fotomultiplicadores (PMT, por sus siglas en inglés de *photomultiplier tube*). Los detectores PD son menos sensibles que los PMT, y se utilizan para coleccionar la señal correspondiente a FSC que es una señal más fuerte. Por otro lado, los detectores PMT al ser altamente sensibles son utilizados para recabar la luz proveniente de SSC y la fluorescencia que son señales más débiles (Adan et al., 2017; Leach et al., 2013).

Los fotones capturados por los detectores PD o PTM se convierten en electrones para generar una corriente eléctrica; la cual viaja a los amplificadores para ser transformada a un pulso de voltaje. (Adan et al., 2017; Givan, 2011).

Para que las señales amplificadas puedan observarse en una computadora deben ser digitalizadas. El voltaje es amplificado por dos tipos de amplificadores, lineal y logarítmico, que asignan un valor numérico a la altura, ancho y área del pulso generado (Fig. 5). Mediante un convertidor análogo a digital (ADC por sus siglas en inglés de *analogue-to-digital convertor*) al valor numérico del pulso de voltaje se le asigna un número de canal para que la información se pueda transferir a una computadora y permitir su posterior análisis (Leach et al., 2013).

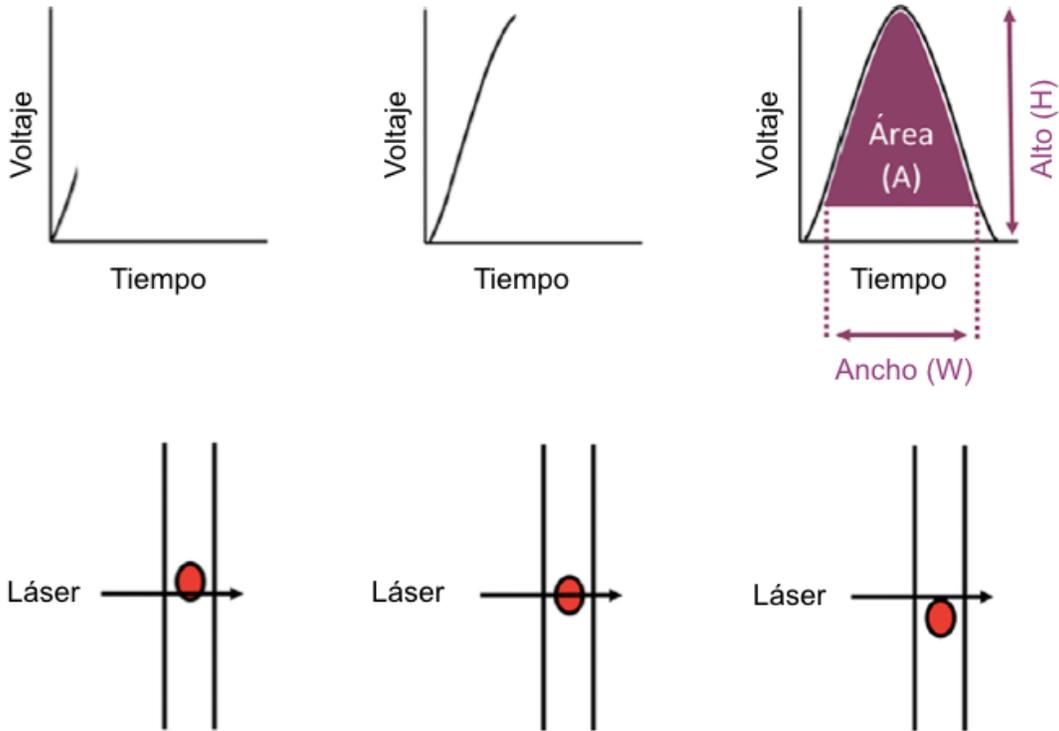


Fig. 5. Componentes del pulso de voltaje. Conforme la partícula pasa por el punto de interrogación se va generando un pulso de voltaje conformado por tres parámetros: ancho (W por su nombre en inglés *width*), altura (H por su nombre en inglés *height*) y área (A). W se refiere al tiempo que tarda la partícula en atravesar el láser, H es el punto máximo del pulso y refleja la intensidad máxima de luz dispersa o fluorescencia. Finalmente, A se refiere al área del pulso y es un valor obtenido a partir de W y H . Imagen tomada de Chantzoura & Kaji, 2017.

La visualización de los datos que se observa en la computadora es diferente dependiendo de la amplificación lineal o logarítmica. La amplificación lineal muestra un rango limitado de intensidad de la señal de los datos, mientras que la amplificación logarítmica muestra un amplio rango de intensidad de señal (Adan et al., 2017; Givan, 2011).

Fluorescencia

Al pasar la muestra por el citómetro de flujo, los dos parámetros que se obtienen de las células son FSC y SSC. Las células pueden tener componentes propios que generan una emisión de fluorescencia; sin embargo, en la citometría de flujo las

células se tiñen con moléculas fluorescentes que permiten la visualización de diversos componentes y así, obtener una mayor información de los fenómenos biológicos (Adan et al., 2017).

-Principio de fluorescencia

El principio de fluorescencia se basa en la propiedad que tienen ciertos compuestos, denominados fluorocromos, para absorber energía luminosa a una longitud de onda y posteriormente emitir luz a una longitud de onda diferente. Todo fluorocromo tiene un intervalo específico de longitud de onda en el cual absorbe energía en forma de luz, lo cual genera que sus electrones que se encuentran en un estado basal asciendan a un estado de mayor energía o estado excitado. Los electrones excitados vuelven a su estado basal rápidamente (en aproximadamente 10 nanosegundos desde su excitación) liberando el exceso de energía en forma de fotones. La longitud de onda describe las ondas electromagnéticas que se propagan como consecuencia de la excitación de la molécula y su valor es inverso a la cantidad de fotones que se liberan. La energía liberada siempre es menor a la energía absorbida debido a que cierta cantidad de energía se libera en forma de calor; el resto de la energía es la fluorescencia observada y tiene una longitud de onda menor a la inicial (Fig. 6) (Adan et al., 2017; Longobardi, 2001).

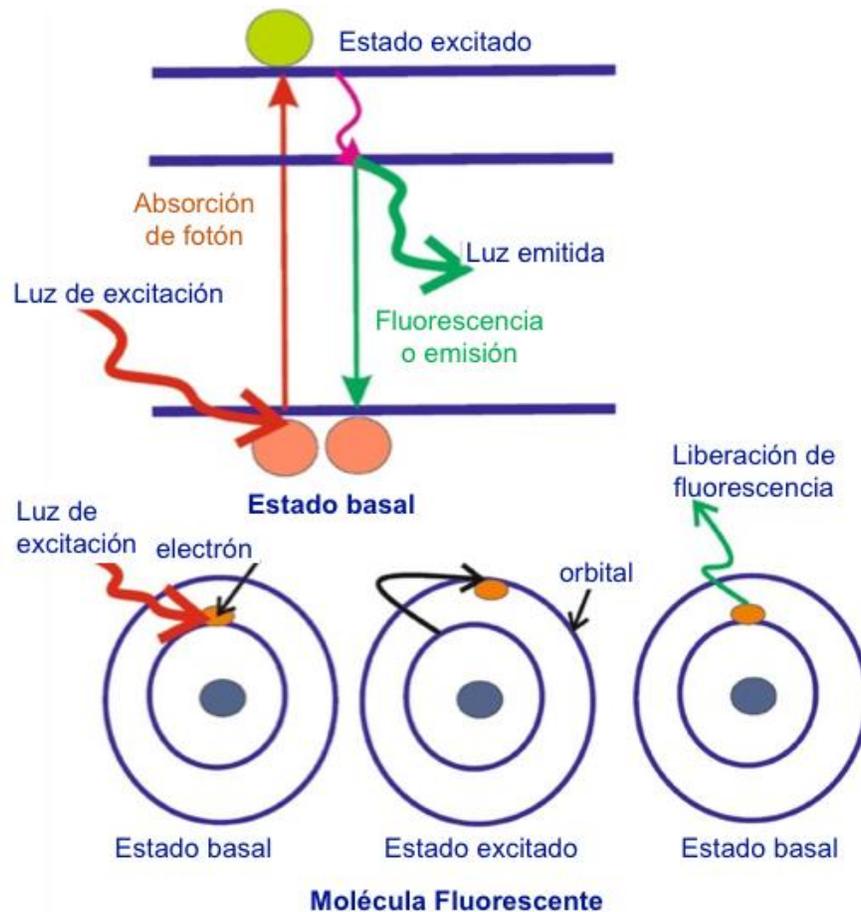


Fig. 6. Principio de emisión de fluorescencia. En una molécula fluorescente los electrones que se encuentran en un estado basal absorben energía en forma de fotones, lo que les permite transitar a un estado excitado. Cuando el electrón pierde la energía lo libera en forma de fotones, lo que genera la fluorescencia observada. Imagen tomada de Dey, 2018

Tipos de fluorocromos utilizados en citometría de flujo

A lo largo de los años se han desarrollado una variedad de fluorocromos que pueden acoplarse a otras moléculas (anticuerpos, sondas o ácidos nucleicos), o se excitan de acuerdo a una propiedad particular de la célula. Como se mencionó anteriormente, cada fluorocromo tiene una longitud de onda de absorción y un rango de longitud de onda de emisión; parámetros que son de gran relevancia para la elección de los fluorocromos a utilizar en la realización de un ensayo de citometría de flujo. Otro factor importante a considerar es el brillo de los fluorocromos. (Ver tabla 1)

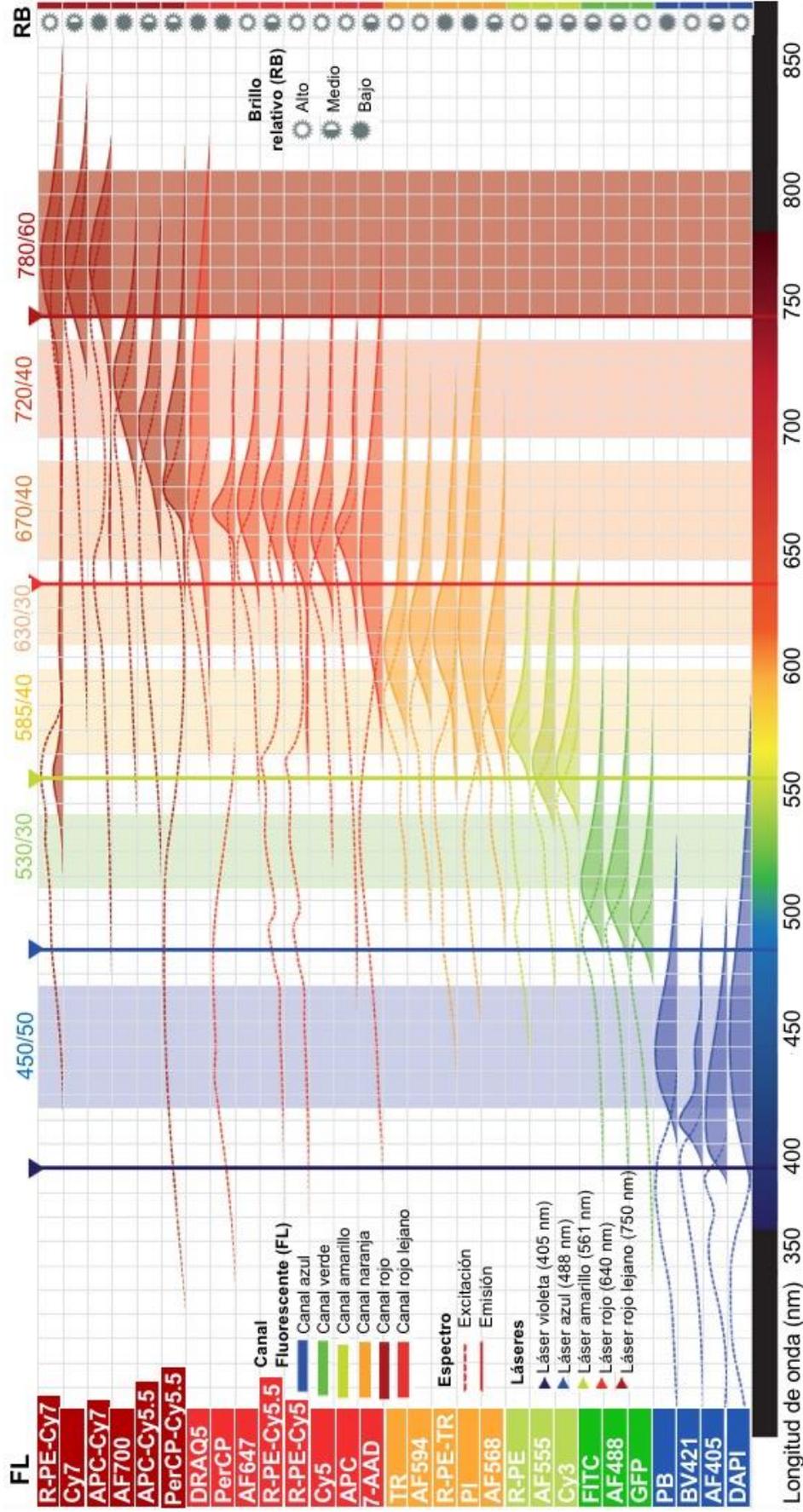


Tabla 1. Espectros de emisión/excitación de algunos de los fluorocromos más utilizados a lo largo de todo el espectro visible. Los fluorocromos se van listando por color. En línea punteada se indica el espectro de excitación y en curva sombreada el espectro de fluorescencia. En la parte superior se encuentran representados algunos de los valores de filtros para la recolección de la fluorescencia. A la derecha se encuentra el valor del brillo relativo para cada fluorocromo clasificado como: alto, medio y bajo. Abreviaciones: Alexa Fluor™(AF), Billian Blue™(BV), Cyanine (Cy), Pacific Blue™(PB), Fluorescein isothiocyanate(FITC), R-Phycoerythrin (R-PE) Propidium Iodide (PI), Texas Red™(TR), 7-AminoacLnomycinD (7-AAD), Allophycocyanin (APC), Peridín Chlorophyll (PerCP). Modificada de (abcam, n.d.)

El brillo de los fluorocromos es una característica intrínseca que presentan las moléculas de cada uno y hace referencia a la intensidad de la señal luminosa que pueden emitir. El brillo de un fluorocromo depende de su capacidad para absorber la luz de manera eficiente (coeficiente de extinción) y la proporción entre los fotones absorbidos y aquellos que son emitidos (rendimiento cuántico) (Flores-Montero et al., 2019; Maciorowski et al., 2017).

El brillo de los fluorocromos en términos generales, se clasifica como muy brillante, brillante, medio y bajo; mediante esta clasificación se pueden encontrar diversas tablas o listas que agrupan a diversos fluorocromos. Generalmente este tipo de guías se pueden encontrar de manera electrónica, son realizadas por sitios especializados como *Fluorofinder* y casas comerciales que venden reactivos para ensayos de citometría de flujo. Ejemplo de ello es la Tabla 1 presentada en la página anterior.

Además de esto, el identificar a un fluorocromo depende de la configuración óptica de los detectores para coleccionar la luz de citómetro (Baumgarth & Roederer, 2000; Maciorowski et al., 2017).

Para una mayor comprensión de los diferentes fluorocromos comúnmente utilizados en la citometría de flujo se pueden dividir en aquellos que se unen a proteínas, aquellos que interactúan con los ácidos nucleicos y finalmente algunos fluorocromos que funcionan como moléculas reporteras.

a) Unión a anticuerpos, proteínas o ligandos

Este tipo de fluorocromos son de gran utilidad para la detección de antígenos y receptores, además de proveer gran información sobre las funciones celulares. Los más utilizados en esta categoría son los fluorocromos acoplados a anticuerpos, como aquellos conjugados con ficoeritrina (PE por su nombre en inglés *phycoerythrin*) o fluoresceína (FITC por su nombre en inglés *Fluorescein isothiocyanate*). Actualmente existe una amplia variedad de fluorocromos que pueden conjugarse con los diferentes anticuerpos, algunos ejemplos son PerCP (por su nombre en inglés *Peridinin-Chlorophyll-Protein*), Alexa Fluor™ 488, APC (por su nombre en inglés *Allophycocyanin*) y Texas-Red. Sumado a estos se encuentran los denominados fluorocromos en tándem, conformados por dos

moléculas fluorescentes unidos con un enlace covalente y que se basan en la transferencia de energía de resonancia (FRET); ejemplo de ellos son PE-APC, PE-Cy5, APC-Cy7 (Adan et al., 2017; Macey, 2007).

Por otro lado, cuando no existe un anticuerpo conjugado con una molécula fluorescente o por el diseño del ensayo no pueden ser utilizados, existen proteínas como estreptavidina, proteína A o avidina que son conjugadas con fluorocromos permitiendo una tinción indirecta de las células (Macey, 2007). Finalmente, otro tipo de tinción indirecta es aquella donde se utiliza un sistema de dos anticuerpos; el primero es un anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula de interés, mientras que el segundo reconoce al primer anticuerpo y se encuentra conjugado con el fluorocromo para permitir la visualización de la señal (Longobardi, 2001).

b) Unión a ácidos nucleicos

Las moléculas fluorescentes que se unen al DNA permiten evaluar la integridad de la membrana, la discriminación de células nucleadas, la cuantificación de DNA y el análisis del ciclo celular. Una misma molécula puede tener varias de estas aplicaciones dependiendo del fundamento con el cual se utiliza y el procedimiento experimental al cual se someten las células. Dentro de los ejemplos que se pueden nombrar se encuentra PI (por sus siglas en inglés de *propidium iodide*), la 7 aminoactinomicina D (7-AAD), DRAQ7™ y DAPI (por su nombre en inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*) fluorocromos que pueden ser utilizados para la medición del ciclo celular y viabilidad. Además de esto, estos fluorocromos en combinación con el marcaje de la proteína Anexina V permite medir la apoptosis.

Hoechst 33342 y Vybrant™ DyeCycle™ son fluorocromos generalmente utilizados para estudiar el ciclo celular (Chantzoura & Kaji, 2017; Macey, 2007).

c) Moléculas reporteras

Las moléculas reporteras pueden funcionar como sustrato o formar conjugados en las células que tras su transformación generan la fluorescencia que puede ser medida mediante un citómetro de flujo.

Fluorocromos como DiOC₆[3] (por su nombre en inglés *3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide*) y JC-1 (por su nombre en inglés *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl- benzimidazolylcarbocyanine iodide*) permiten la evaluación del potencial mitocondrial. De forma general son compuestos de carácter lipofílico con carga positiva, lo que les permite atravesar fácilmente la membrana mitocondrial y acumularse en el interior. Con un alto potencial mitocondrial se acumula una mayor cantidad de estos compuestos en el interior; mientras que en el caso contrario la cantidad de este tipo de fluorocromos será menor (Cossarizza et al., 2019).

DiBAC₄[3] (por su nombre en inglés *Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol*) es utilizado para el potencial de membrana debido a que al ser una molécula lipofílica con carga negativa no atraviesa la membrana mitocondrial. En un ambiente hiperpolarizado existe una menor concentración de DiBAC₄[3] en el citoplasma. Mientras que, en caso contrario, en una despolarización mayor cantidad de DiBAC₄[3] (Adams & Levin, 2012; Macey, 2007).

INDO-1 es una molécula usada para medir la movilización intracelular de Ca²⁺ en la célula. Una mayor concentración de Ca²⁺ genera más unión con INDO-1 con un espectro de emisión alrededor de 475 nm; por otro lado, una menor movilización de Ca²⁺ provoca menor unión y el espectro de emisión desciende a un valor alrededor de 400 nm. H₂DCFDA (por su nombre en inglés *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*) es una molécula permeable en la membrana que tras sufrir una desacetilación y ser convertida a su forma oxidada por las especies reactivas de oxígeno emite fluorescencia (Cossarizza et al., 2019; Macey, 2007).

El fluorocromo CFSE (por su nombre en inglés *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) es una de las moléculas utilizadas para estudiar la proliferación celular. De manera general CFSE o sus análogos, son moléculas permeables que se unen a los grupos amino de las proteínas intracelulares, lo que permite su retención al interior de la célula. De esta forma, la cantidad fluorocromo comienza a diluirse entre las células conforme ocurre la división (Chantzoura & Kaji, 2017).

Finalmente, otro tipo de molécula que puede ser utilizada en ensayos de citometría de flujo es la proteína verde fluorescente (GFP, por su nombre en inglés *Green*

Fluorescent Protein) o sus análogos como RFP (*Red Fluorescent Protein*) o YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Mediante un procedimiento de transducción se puede producir una célula que exprese la proteína de interés conjugada con GFP. Su punto máximo de emisión es en aproximadamente 488nm lo que permite la visualización de la fluorescencia verde en el citómetro de flujo (Telford et al., 2012).

Estos son algunos de los fluorocromos más utilizados en los ensayos de citometría de flujo. Sin embargo, la elección de los diferentes tipos de fluorocromos depende del objetivo del estudio y de la configuración del citómetro de flujo, para conocer si los fluorocromos son compatibles con la configuración del equipo y es posible su detección (Flores-Montero et al., 2019).

Información que proporciona la citometría de flujo

A partir del proceso de transformación y digitalización realizado por el sistema electrónico los datos pueden ser analizados, proceso que comprende la generación de gráficos y la estadística correspondiente para generar el reporte necesario. De una célula se puede obtener una gran cantidad de información, sin embargo, debe ser compactada en valores que puedan ser evaluados de manera estadística. La creación de un gráfico permite la observación de patrones o tendencias que puedan presentar los datos (Roederer et al., 2004).

En la citometría de flujo existen dos tipos de gráficos utilizados dependiendo de la información requerida: gráficos de un parámetro o dos parámetros.

a) Un parámetro: histogramas

Los histogramas muestran la distribución de un sólo parámetro, colocando en el eje "x" los valores del parámetro a interpretar (fluorescencia, FSC o SSC) y en el eje "y" el número de eventos (células). Los histogramas son útiles para observar diferentes patrones de expresión entre muestras para un sólo parámetro. Así mismo, mediante la determinación de una fracción positiva a un parámetro o marcador se puede realizar la comparación entre muestras y el control, lo que permite el reporte de células positivas para el parámetro en estudio (Fig. 7) (Roederer et al., 2004; Rothe, 2009).

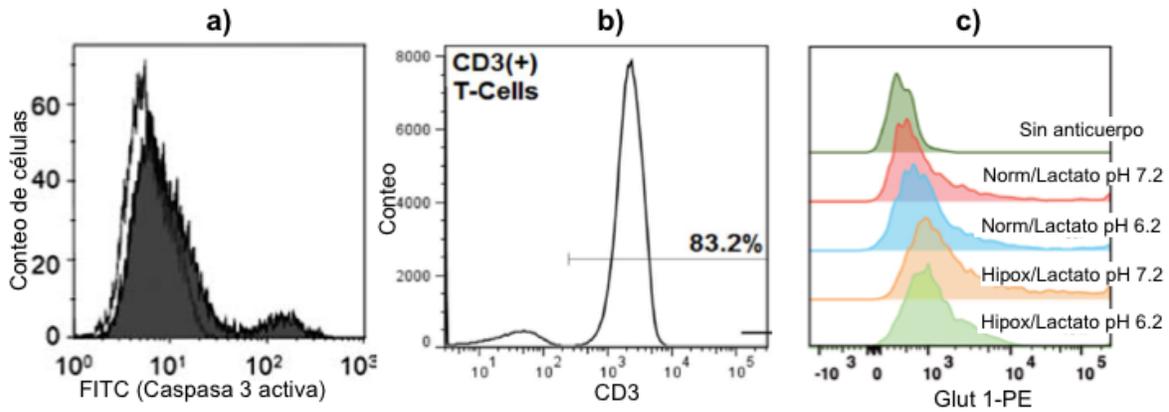


Fig. 7. Diversas representaciones de histogramas. a) gráfica de activación de caspasa 3 en la línea celular MDA-MB-231: en gris la muestra con tratamiento experimental, en línea sin contorno la muestra sin tratamiento; b) histograma de expresión de CD3 en linfocitos T marcando el porcentaje de células positivas; c) Gráficas de la expresión del transportador Glut 1 en la línea celular A-427 sometida a diferentes condiciones experimentales. Imágenes obtenidas de Cossarizza et al., 2019; Prado-Garcia et al., 2020; Verschoor et al., 2015.

Además del porcentaje de células positivas, otro dato de las células que se puede obtener de un histograma es la intensidad media de fluorescencia (MFI); el cual es un valor que permite relacionar la distribución de fluorescencia en la población representada. Existen tres tipos de intensidad de fluorescencia que pueden ser reportados basados en las medidas de la tendencia central; éstos son la media, mediana o media geométrica de fluorescencia. La elección del tipo de MFI que debe reportarse depende de la distribución que se tiene de los datos. La media es útil a reportar cuando los valores tienen una distribución Gaussiana, la media geométrica conviene en valores con distribución logarítmica. Los valores de la media y media geométrica son más susceptibles a pequeños cambios por valores atípicos. Por ello es usualmente más utilizado el valor de la mediana, ya que es menos susceptible a estos cambios y no se ve alterada por la distribución de los datos; siendo así un valor más robusto para reportar (Cossarizza et al., 2019; Shapiro, 2003).

b) Dos parámetros: gráfico de puntos, contorno y densidad

Este tipo de gráficas son las más conocidas para la citometría de flujo, permite la representación de dos parámetros correlacionados en un sólo gráfico. De forma

general este tipo de gráfico puede ser dividido en cuadrantes y dependiendo de la fluorescencia emitida por las células se tienen cuatro tipos de poblaciones: dobles negativas (sin expresión de ninguna fluorescencia), positivas al fluorocromo 1, positivas al fluorocromo 2 y dobles positivas (expresión de ambas fluorescencias) (Fig. 8) (Givan, 2011; Rothe, 2009)

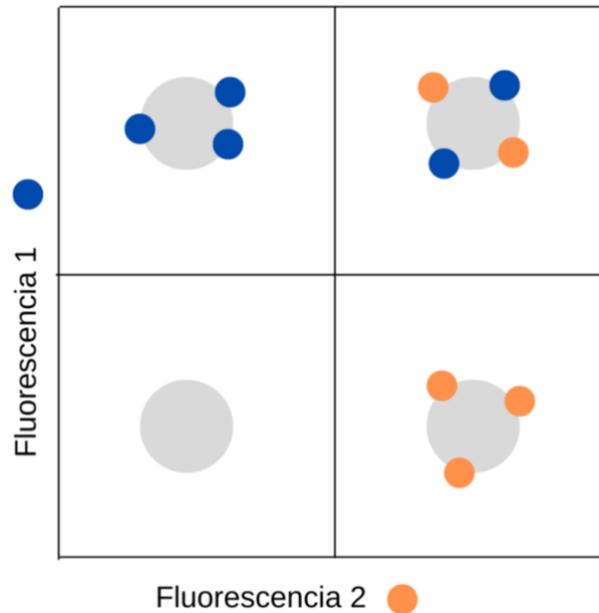


Fig 8. División en cuadrantes de un gráfico de dos parámetros. Como ejemplo se presentan dos tipos de fluorescencias hipotéticas; las células pueden tener cuatro combinaciones posibles, la presencia de solo la fluorescencia azul, células con solo la fluorescencia naranja, células que tienen la fluorescencia azul y naranja y finalmente las células sin ninguna de las dos fluorescencias.

El gráfico de puntos, de contorno y de densidad (pseudocolor) son los tres tipos de representaciones gráficas de dos parámetros más comunes en la citometría de flujo (Fig. 9). En el gráfico de puntos (*dot-plot* en inglés) cada punto corresponde a un evento que es acomodado en coordenadas “x” y “y” de acuerdo a la intensidad de la señal que presente para los dos parámetros (Rothe, 2009).

El gráfico de contornos permite la visualización de los eventos que se encuentran en la misma coordenada mediante la representación de líneas de contorno y sin la saturación del gráfico como puede ocurrir en el *dot plot*. Cada línea puede encerrar los eventos con una probabilidad del 2%, 5% ó 10%, de manera que el último

contorno contiene aproximadamente el 95% de todos los eventos graficados (FlowJo, n.d.; Herzenberg et al., 2006). Por otro lado, el gráfico de densidad (o pseudocolor) utiliza un rango de colores para indicar que los eventos se encuentran en una misma posición, es decir, la frecuencia de los eventos en cierta región (Roederer et al., 2004).

En comparación con el gráfico de puntos, los gráficos de contornos y pseudocolor proveen de una mejor representación de las frecuencias de los datos obtenidos, facilitando la discriminación de diferentes regiones en el gráfico (Herzenberg et al., 2006).

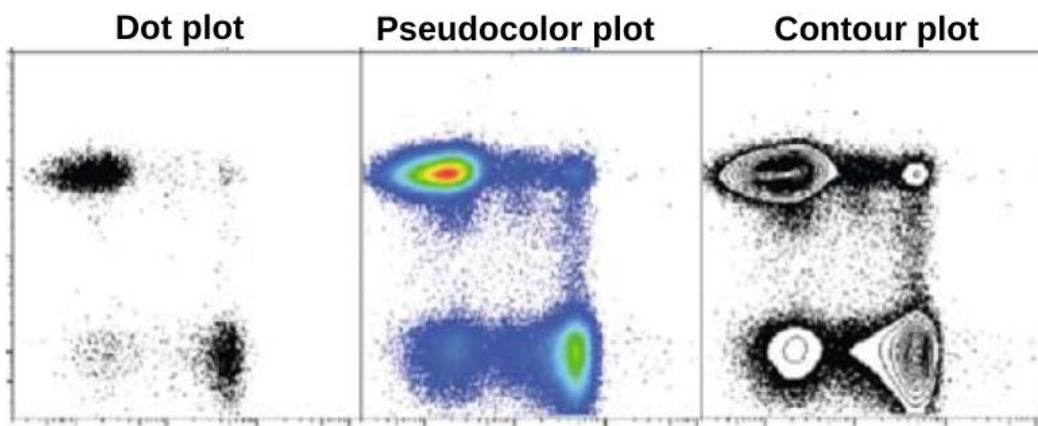


Fig. 9. Tipos de gráficos de dos parámetros más usados en la citometría de flujo. Modificado de Roederer 2004.

A partir de este tipo de gráficos se puede obtener el porcentaje de células que son positivas a las moléculas de interés en la gráfica. Además, son de gran utilidad para generar la estrategia de análisis de los datos del experimento, ya que permiten ir seleccionando regiones de poblaciones celulares de interés de manera consecutiva (Roederer et al., 2004; Rothe, 2009).

Requerimientos básicos para un ensayo de citometría de flujo

Dependiendo del fenómeno que se pretende estudiar en las células, el procedimiento para realizar un ensayo de citometría de flujo puede variar. Sin embargo, para una mayor comprensión del diseño de un ensayo básico se puede

dividir en las siguientes etapas: fase pre-analítica, fase analítica y fase post-analítica. Este apartado se concentra en la fase pre-analítica que abarca los aspectos de la preparación de la muestra, el marcaje de las células así como el diseño del panel y la compensación; durante la fase analítica se realiza la adquisición de los datos haciendo uso del panel y aplicando la compensación correspondiente. Finalmente, el análisis de los datos corresponde a la fase post-analítica (Fig. 10) (Maecker et al., 2012).

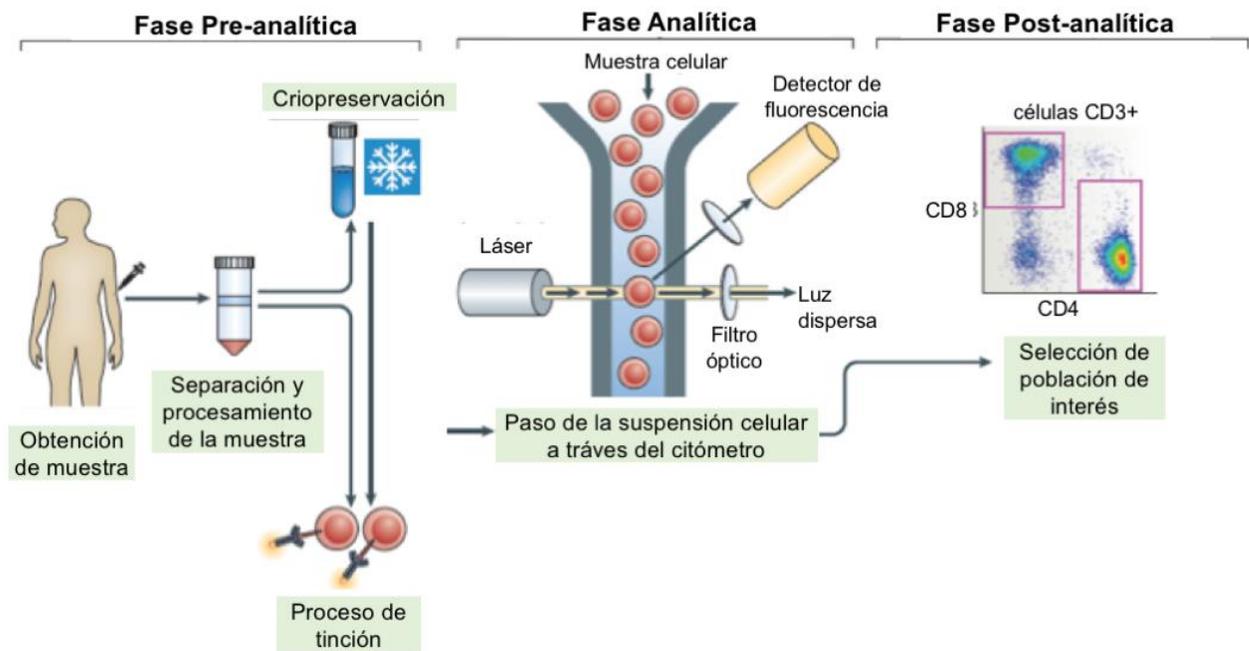


Fig. 10. Etapas generales de un ensayo de citometría de flujo: fase Pre-analítica, fase Analítica fase Post-analítica. Imagen modificada de Maecker et al., 2012.

-Preparación de la muestra

Para que una muestra pueda ser analizada por el citómetro es necesario que se encuentre en suspensión. Si la muestra ya se encuentra en suspensión, como es el caso de una muestra de sangre o médula ósea, pueden solo realizarse procesos de filtración y centrifugación para eliminar restos celulares agregados o poblaciones celulares que no son de interés (Cossarizza et al., 2019; Longobardi, 2001). En el caso de un tejido o un cultivo de células, la suspensión celular se puede preparar por método mecánico o enzimático; en cualquiera que sea utilizado es conveniente medir la viabilidad y el conteo de las células que se obtienen al final. Mayores

detalles en el procedimiento de preparación de la suspensión depende del objetivo a estudiar en las células (Cossarizza et al., 2019).

-Marcaje

Lo siguiente a revisar en la preparación de la muestra es el proceso de marcaje o tinción de las células. Dependiendo de la ubicación de las moléculas a marcar con el fluorocromo, el marcaje puede ser en la membrana citoplásmica o a nivel intracelular.

Las tinciones de superficie permiten la detección de una gran cantidad de moléculas con el uso de anticuerpos, receptores de ligando o sondas; como el caso de Anexina V que detecta la salida de fosfatidilserina en la membrana (Cossarizza et al., 2019). Además de esto, las tinciones de superficie permiten la inmunofenotipificación de células; ya que mediante marcadores de superficie conocidos como marcadores de linaje se puede realizar la discriminación de diferentes poblaciones celulares.

El marcaje intracelular detecta la expresión de diferentes moléculas como factores de transcripción, citocinas, quimiocinas o de componentes del citoesqueleto. Para la detención de algunos marcadores intracelulares puede ser necesario que las células sean primero estimuladas para su expresión (Cossarizza et al., 2019).

El procedimiento detallado de cómo realizar el marcaje celular depende de las características del ensayo y la molécula objetivo del estudio. Sin embargo, en una tinción de superficie suele realizarse el proceso de fijación para mantener la estructura y locación de las moléculas. En una tinción intracelular se realiza la fijación y además la permeabilización que permite la entrada de los anticuerpos al interior de la célula (Cossarizza et al., 2019).

Independientemente del tipo de tinción que se pretenda llevar a cabo es importante revisar la viabilidad de las células, ya que las células muertas pueden generar uniones inespecíficas con los anticuerpos utilizados y producir señales falsas positivas (Cossarizza et al., 2019). La elección de las moléculas para reportar la viabilidad depende del tipo de marcaje realizado, por ello es necesario conocer el fundamento del fluorocromo de viabilidad para determinar si es compatible con el procedimiento experimental.

-Creación de panel y compensación

La elección de los fluorocromos es parte importante del diseño del ensayo de citometría. Para el uso de diferentes marcadores y fluorocromos en un ensayo de inmunofenotipificación o en el estudio de las funciones biológicas que se pueden medir en citometría de flujo, es necesario conocer algunos puntos clave con el fin de crear un panel de fluorocromos que permita obtener resultados sin demasiadas interferencias que compliquen el análisis de los datos.

Los pasos más importantes para la creación del panel son los siguientes que se observan en la figura 11:

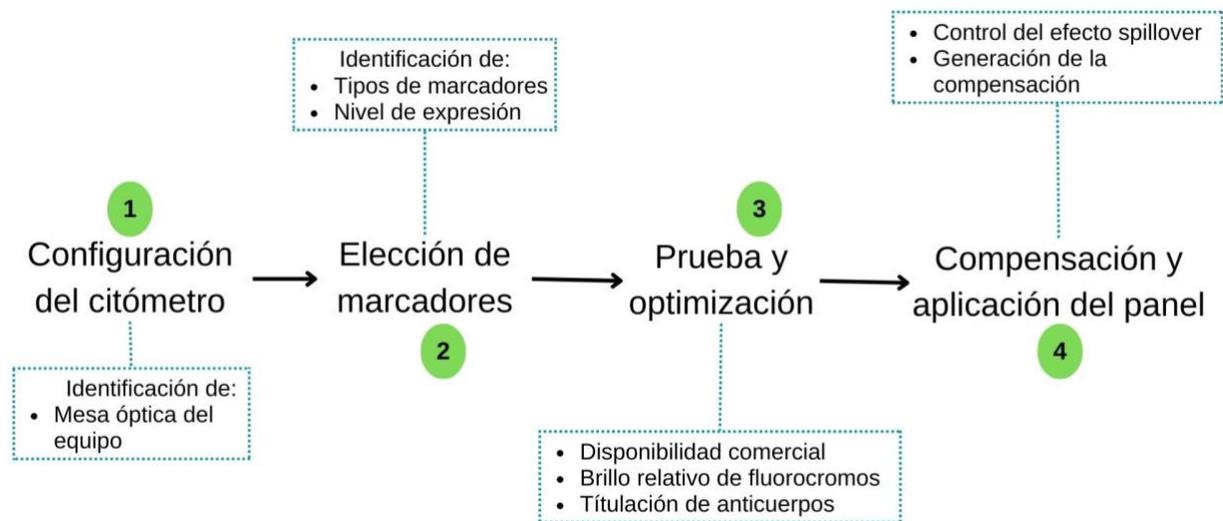


Fig. 11. Fases del diseño de panel para un ensayo de citometría de flujo. En recuadros los aspectos a destacar de cada fase. Imagen basada en Holmberg-Thyden et al., 2021.

1) Configuración del citómetro de flujo:

Conocer la configuración de láser y filtros (mesa óptica) con las que cuenta el equipo a utilizar permite la elección de los fluorocromos que son posibles emplear y aquellos que son incompatibles. Se pueden encontrar tablas que indican los diferentes fluorocromos que son excitados con los diferentes tipos de longitud de onda de los láseres. Cuando el número de fluorocromos a utilizar es reducido, es recomendable utilizar diferentes láser y fluorocromos en los que su espectro de emisión se encuentre más distante entre ellos (Bunshell, 2015; Maciorowski et al., 2017).

2) Elección de marcadores

Es necesario investigar los tipos y la expresión de marcadores en las células de estudio. Existen en general dos tipos de marcadores, los marcadores de linaje que permiten la identificación de poblaciones celulares a un fenotipo en particular. Por otro lado, se encuentran los denominados marcadores de interés. Estos últimos pueden presentar diversos patrones de expresión dependiendo de las condiciones experimentales o tener una expresión desconocida que va a estudiarse (Mair & Tyznik, 2019).

Otro aspecto a considerar es la densidad con la cual se expresan los marcadores. Clasificando los niveles de expresión en baja, intermedia, alta o desconocida se puede decidir con qué fluorocromo es mejor identificar cada marcador. Ya que los fluorocromos tienen diferente intensidad de brillo, es conveniente escoger aquellos fluorocromos con alto brillo para las moléculas que presentan un poco o desconocida expresión en la célula y en caso contrario para las moléculas con alta expresión suelen utilizarse los fluorocromos con bajo brillo. (Maciorowski, et.al, 2017)

3) Prueba y optimización

Un aspecto muy importante a considerar es la disponibilidad de los diferentes anticuerpos y moléculas reporteras que se encuentran ya conjugadas con los diversos fluorocromos y que están disponibles comercialmente; ya que esto puede limitar el diseño del panel y de ser necesario adaptar a la disponibilidad de algunos fluorocromos.

Además de lo hasta ahora mencionado para generar una buena combinación de fluorocromos a utilizar, un valor que puede ayudar a la elección es el índice de tinción. El índice de tinción (SI por sus siglas en inglés) es un valor que indica la separación entre la población positiva y negativa de un fluorocromo, permitiendo comparar el brillo relativo de los diferentes fluorocromos. A un mayor valor de índice de tinción la separación entre ambas poblaciones es mayor y viceversa. (BioLegend-Blogs, n.d.; Bunshell, 2015). El SI está influenciado por las propiedades intrínsecas del fluorocromo, pero también por la configuración óptica del citómetro

y los ajustes que se le hagan al mismo; por ello no puede tomarse como un valor único para la elección de los fluorocromos (Maciorowski et al., 2017).

Una vez elegido el panel de fluorocromos tomando en cuenta lo antes mencionado, es importante realizar la titulación de los mismos. La casa comercial de los fluorocromos proporciona una concentración recomendada para su uso; sin embargo, el objetivo de la titulación tiene como fin encontrar la mejor concentración del reactivo. De esta manera se busca reducir las interferencias por uniones no específicas del anticuerpo, disminuir su desperdicio y ajustarlos a las condiciones experimentales a probar (Bunshell, 2015; Cossarizza et al., 2019; Mair & Tyznik, 2019).

4) Uso y compensación

Para el uso del panel es necesario tomar en cuenta la superposición de los espectros de emisión de los fluorocromos (conocido por su nombre en inglés como *spillover*) y en consecuencia la generación de la matriz de compensación. Un fluorocromo tiene un rango de emisión de fluorescencia determinado y este espectro de emisión puede coincidir con la excitación o emisión de otros fluorocromos, generando que las fluorescencias se traslapen en los diferentes canales de detección. Lo anterior es conocido como *spillover* y existen tres fuentes que lo generan: el traslape de los espectros de emisión continuos, la inestabilidad de los fluorocromos en tándem y la excitación por láseres diferentes de dos fluorocromos con un espectro de emisión similar (Maciorowski et al., 2017).

A pesar de tener cuidado en el diseño de panel, es posible que se presenten ciertas interferencias al momento de adquirir los datos consecuencia del *spillover*, por ello es necesario realizar el proceso de compensación.

La compensación es el proceso matemático que permite calcular la cantidad de fluorescencia de un fluorocromo en el canal de otro fluorocromo y así sustraer esa señal no deseada. El objetivo de la compensación es asegurar la detección de la señal individual de cada fluorocromo y que los datos observados no sean afectados por el *spillover* (Fig. 12) (Bunshell, 2015; Maciorowski et al., 2017).

Actualmente la compensación es calculada de manera automática por los programas de adquisición y análisis de citometría de flujo. Con ayuda de los

controles de compensación, el programa genera una matriz de compensación que puede ser aplicada a todas las muestras del experimento (Maciorowski et al., 2017).

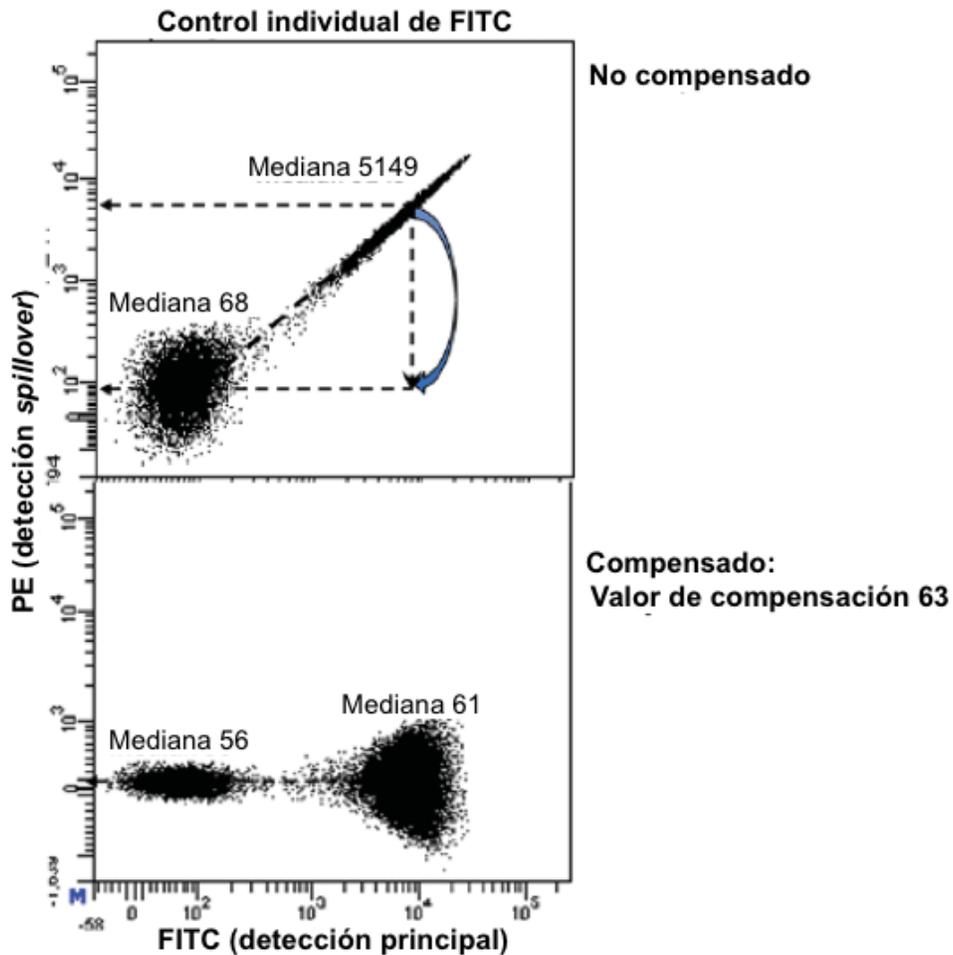


Fig. 12. Cálculo y aplicación de la compensación para las señales de FITC (eje x) y PE (eje y) en un tubo que marcado sólo con FITC. En la gráfica superior se observa los datos sin compensar con una señal positiva para PE (población en diagonal). Tras realizar el proceso de compensación, la señal positiva a PE desaparece y las poblaciones se alinean horizontalmente con valores de MFI similares. Imagen tomada de Maciorowski et al., 2017.

-Controles

Como en cualquier ensayo biológico, el uso de controles es indispensable para la generación de resultados confiables y de calidad que puedan ser posteriormente analizados. Permiten la distinción entre una respuesta positiva y negativa, además de evitar resultados que puedan ser falsos positivos. Dos tipos de controles son

utilizados en la citometría de flujo, los controles de citometría y los controles biológicos.

Controles de citometría

1) Células sin tinción (autofluorescencia)

Las células pueden presentar cierta cantidad de fluorescencia por la presencia de moléculas con anillos aromáticos como NADPH, flavinas o algunos aminoácidos; lo que genera errores en la detección de las moléculas blanco por una disminución en la resolución y sensibilidad de la señal. Este tipo de control es usado para calcular la compensación y ajustar el voltaje en los detectores PMT tomando en cuenta la fluorescencia basal de las células a analizar (Bunshell, 2015; Staats et al., 2019).

2) Compensación

Los controles de compensación son utilizados para generar la matriz de compensación que permite disminuir el *spillover*. Se debe contar con un control para cada marcador fluorescente que se incluye en el panel, por lo que el número de tubos control varia dependiendo del experimento. Para el control se utilizan células, perlas conjugadas con un fluorocromo en particular o perlas de captura recubiertas con el anticuerpo de interés. Independiente del tipo de control que se utilice, se debe someter a las mismas condiciones experimentales que las muestras experimentales (Maecker & Trotter, 2006; Sun et al., 2021).

Para lograr una adecuada compensación es necesario que se utilicen los mismos fluorocromos en los tubos para compensar y en las muestras problema. Además de esto, los controles de compensación deben emitir fluorescencia con la misma intensidad que las muestras problema (Bunshell, 2015).

3) Control de isotipo

El control de isotipo corresponde a anticuerpos de la misma clase de inmunoglobulina y la misma marca fluorescente que el anticuerpo de estudio pero que está dirigido a un antígeno que se presume no se encuentra en las células de estudio. Funciona como un control negativo al representar las uniones no específicas de la tinción con los anticuerpos. Actualmente este tipo de control es menos usado debido a que presenta dos principales limitaciones, la primera de ellas

es que el nivel de tinción que genera puede variar entre anticuerpos con el mismo fluorocromo y el segundo es que no toma en cuenta el *spillover* como es el caso del control FMO. Así mismo, al utilizar este anticuerpo se da por hecho que el control de isotipo tiene la misma concentración que el anticuerpo a evaluar, que no presenta uniones inespecíficas con las células que se están evaluando y que tiene el mismo radio fluorocromo/proteína de acoplamiento (Maecker & Trotter, 2006; Staats et al., 2019; Sun et al., 2021).

Finalmente, respecto a su uso, actualmente existe una controversia sobre que tan conveniente es utilizar este tipo de control. Debido a las desventajas que puede presentar se ha disminuido su uso y es preferible usar el control FMO.

4) Fluorescencia menos uno (FMO por sus siglas en inglés *Fluorescence Minus One*)

El tubo de control FMO contiene todos los fluorocromos utilizados en el panel excepto uno, proporcionando así información sobre la dispersión de las otras fluorescencias en el canal de interés. Debido a que en los tubos FMO solo una variable es modificada, su uso permite distinguir las señales positivas de las negativas cuando se comparan con las muestras problema y la señal puede ser atribuida a las condiciones experimentales a probar y no a la interferencia de los demás fluorocromos utilizados en el panel (Cossarizza et al., 2019; Sun et al., 2021).

5) Viabilidad

El control de viabilidad permite distinguir entre células muertas y vivas en la muestra, basándose en la retención o exclusión del fluorocromo de viabilidad en la célula. Existen tres tipos de fluorocromos que pueden ser utilizados, los primeros de ellos son aquellos que se unen al DNA y se mencionaron anteriormente como PI, 7-AAD y DAPI. En el caso de ensayos que requieren permeabilizar y fijar las células se pueden usar los fluorocromos con unión a los grupos aminos de las proteínas, ejemplos de este tipo son las diferentes variaciones de LIVE/DEAD™, ZombieDye™, Fixable viabilit dyes™, Por último, la Calceina AM es un colorante vital que emite fluorescencia como consecuencia de una actividad metabólica en la célula (Cossarizza et al., 2019; McKinnon, 2018; Sun et al., 2021).

6) Anticuerpo secundario

Este tipo de control se utiliza cuando se realiza una tinción indirecta en la cual se requieren dos anticuerpos; el primero dirigido hacia la molécula de interés mientras que el segundo reconoce el primer anticuerpo y tiene conjugado un fluorocromo que genera la señal luminosa. En control del anticuerpo secundario consiste en incubar la muestra sólo con el anticuerpo secundario, con el fin de determinar una posible unión inespecífica y demostrar que la señal más brillante que se observa es debido a la interacción entre el anticuerpo primario unido a la célula y el anticuerpo secundario (Barbierato et al., 2012; Donaldson, 2015)

Controles biológicos

La correcta selección de los controles biológicos depende de un adecuado diseño experimental, por ello es necesario comprender la función de cada control. De manera general, los controles biológicos se pueden dividir en dos tipos: control positivo y negativo.

1) Control positivo

El objetivo de este control es observar la respuesta a evaluar, demostrando que puede ser detectada en la muestra y con el diseño experimental realizado. Un control positivo puede tener diferentes orígenes dependiendo del experimento. Puede ser una muestra que es estimulada con un agente químico conocido y que genera la respuesta, o una población celular en la cual se expresan los marcadores de interés (Maecker & Trotter, 2006).

2) Control negativo

Contrario al control positivo, la finalidad de este control es que no se observe la respuesta que se pretende investigar, ayudando a distinguir entre resultados positivos y negativos. En este caso, puede ser una población celular que no exprese los marcadores de interés sometida a las mismas condiciones experimentales. Por otro lado, en ensayos de estimulación un buen control negativo es una muestra sin estímulo, ya que considera el *spillover* y la unión inespecífica que puedan tener los fluorocromos en el canal de la medición de interés (Cossarizza et al., 2019; Maecker & Trotter, 2006).

Hasta este punto, se ha mencionado todos los aspectos importantes a considerar para la preparación de la muestra junto con el diseño del panel. Posteriormente se puede realizar la lectura de las muestras en el equipo o citómetro de flujo para finalmente realizar el análisis de los datos.

Análisis supervisado de citometría de flujo

Dentro de la fase post-analítica de un experimento de citometría, el análisis de datos es un proceso que puede llegar a ser complejo. El avance en la instrumentación y reactivos permite en un citómetro de flujo la detección de más parámetros de manera simultánea y en diferentes condiciones experimentales, lo que genera que los datos que se deben procesar y analizar sean cada vez más complejos y los programas que se requieren sean más avanzados (Lugli et al., 2010).

A pesar de los avances en las herramientas de análisis de datos uno de los métodos clásico es el conocido como *gating* manual, el cual continúa siendo muy utilizado sobretodo en aquellos casos con pocos parámetros. Las herramientas de análisis se pueden clasificar en dos tipos supervisados y no supervisados. En un análisis supervisado el operador conduce el análisis de los datos mientras que, en los análisis no supervisados a pesar de que existe un proceso de preselección, la mayoría del análisis de selección y agrupación de los datos lo realiza el software utilizado. Los análisis no supervisados permiten la generación de modelos descriptivos que se ajusten a la estructura de los datos y el descubrimiento poblaciones celulares con patrones de expresión no antes identificados dentro de una gran cantidad de datos. Por lo otro lado, los análisis supervisados son utilizados para la generación de modelos predictivos con el fin de relacionar el dato obtenido con la variable de interés. Son útiles cuando se pretende replicar un experimento de una población bien identificada. El *gating* manual corresponde a un análisis supervisado (Cossarizza et al., 2019; Wang & Brinkman, 2019).

El método de *gating* consiste en la identificación de las células de interés dentro de una muestra heterogénea a través de la selección manual y secuencial de regiones en las gráficas de un parámetro o dos parámetros, permitiendo así el análisis en la población de interés (Fig 13).

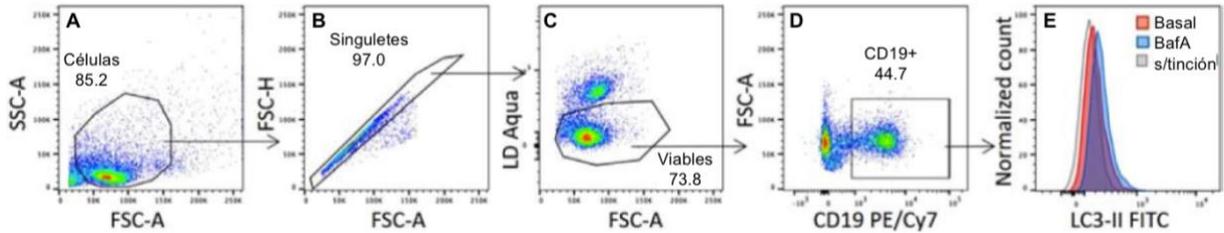


Fig. 13. Ejemplo de selección secuencial de *gates* (A-E). Las regiones utilizadas para graficar en el siguiente paso se encuentran en contorno negro. La selección de regiones va de lo general a lo particular. Imagen tomada de Cossarizza et al., 2019.

El procedimiento de *gating* consiste en la selección de regiones en las gráficas; una región es un grupo de células que comparten ciertas similitudes en términos de la dispersión de la luz como son el tamaño, granularidad y la intensidad de fluorescencia. Como se observa en el ejemplo de la figura 13, la selección en las gráficas A y B es mediante los eventos con similitud entre su tamaño y granularidad, mientras que en C, D y E se realiza tomando en cuenta la intensidad de fluorescencia que pueden presentar con los diferentes fluorocromos utilizados. Esta selección secuencial en cada tipo de gráfica se explicará más a detalle en las siguientes secciones de este trabajo.

El término *gate* se refiere a la región seleccionada en la gráfica y es de utilidad para definir a la población de células del análisis final. Así cada *gate* que se va generando de manera secuencial funciona como un filtro para eliminar interferencias e ir definiendo la población en la cual se requiere medir el fenómeno a estudiar (Fig. 14) (Givan, 2011; Longobardi, 2001; Montante & Brinkman, 2019).

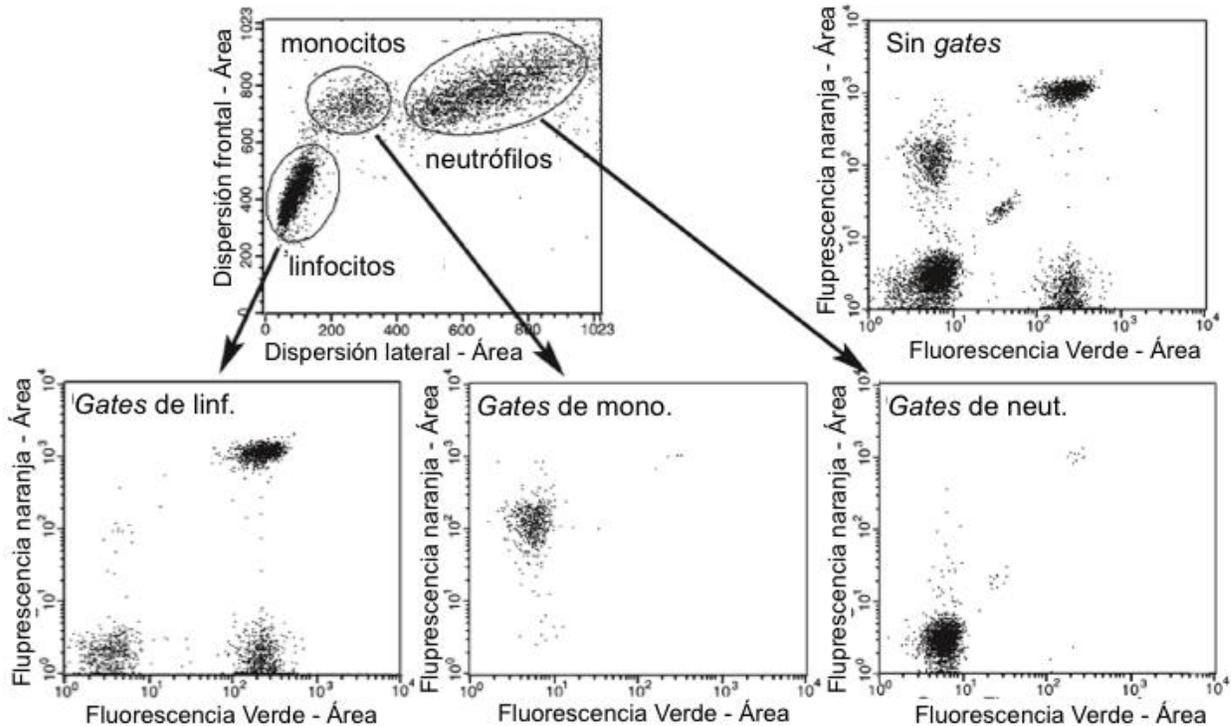


Fig. 14. Ejemplo de obtención de *gates*. Dentro de la gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron tres poblaciones diferentes para generar tres *gates* independientes. En cada *gate* se observan los patrones de fluorescencia (verde y naranja) de cada población. En un análisis directo de las fluorescencias sin la selección de *gates*, no se pueden distinguir los patrones de fluorescencia de cada población. Imagen tomada de Givan, 2011.

A pesar de las limitaciones que puede tener esta estrategia de análisis, el método de *gating* continúa siendo muy utilizado. Su comprensión puede favorecer el entendimiento de los principios de técnicas más avanzadas para el análisis de datos multiparamétricos. Es por esto que es necesario la generación de una guía que indique los principales *gates* que debe contener un análisis de citometría.

La creación de *gates* y el análisis completo puede variar dependiendo del objetivo del estudio. Sin embargo, existen *gates* que son comúnmente utilizadas dentro de varias de las aplicaciones que la citometría de flujo tiene y deben incluirse en un análisis manual básico como un control de calidad.

a) Gate de tiempo

Este tipo de *gate* funciona como un buen parámetro de control de calidad ya que permite identificar las alteraciones temporales en la dinámica del flujo de la muestra.

El flujo de la muestra puede verse alterado por las diferencias de presiones y densidad utilizadas para generar el flujo hidrodinámico, siendo más inestable al inicio y final de la adquisición. La presencia burbujas de aire o partículas largas son las dos principales causas de la interrupción temporal del flujo lo que puede generar una alteración en la señal de fluorescencia obtenida en ciertos periodos, dando como consecuencia anomalía en los datos (Fig. 15) (Fletez-Brant et al., 2016; Staats et al., 2019).

Para la selección manual del *gate* de tiempo se puede graficar FSC, SSC o la fluorescencia contra el tiempo y escoger la región más homogénea del flujo, aquella donde se observe un patrón continuo de datos y con valores similares del parámetro de FSC, SSC o fluorescencia. En caso de tener espacios entre secciones de células, la selección se debe hacer en la región donde no se observan puntos que indiquen la presencia de las células, es decir debe existir espacios vacíos entre cada sección de células.

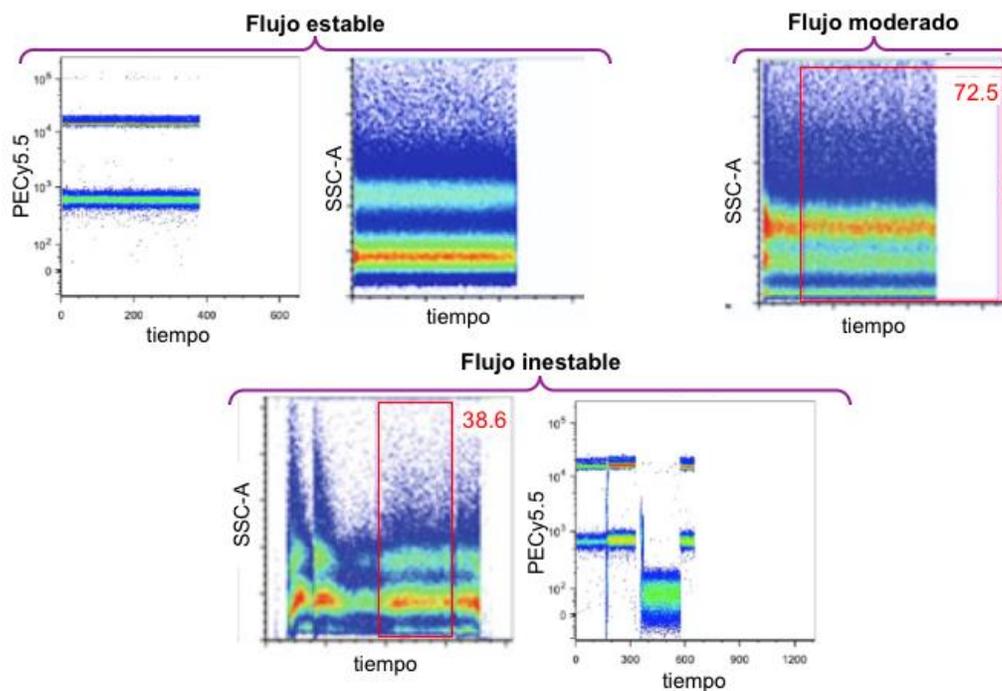


Fig. 15. Ejemplos de flujos y su clasificación dependiendo de su estabilidad. Imágenes tomadas de Bunshell, 2015; Staats et al., 2019.

b) Gate de células individuales

El objetivo de este *gate* es eliminar agregados de células (también conocidos como dobletes) así como restos celulares de la población de interés para análisis posteriores. Estas interferencias se forman por factores propios de las células como el daño, la desintegración de las células muertas o en proceso de muerte, la presencia de moléculas adherentes y la presentación antigénica. También puede ser por factores durante la preparación de la muestra como la incompleta degradación de los tejidos, una alta concentración de la muestra o una alta velocidad del flujo. (Staats et al., 2019; Wersto et al., 2001).

Como se explico anteriormente en el apartado del sistema electrónico, por cada evento que pasa por el citómetro se genera un pulso de voltaje con un valor de altura (H), ancho (W) y área (A). La forma más común de generar este tipo de *gate* es utilizando el parámetro de FSC, graficando FSC-A vs FSC-H o FSC-A vs FSC-W; aunque también puede realizarse con el parámetro de SSC en lugar del tamaño. (Stadinski & Huseby, 2020; Sun et al., 2021). La región a seleccionar en estos casos es aquella donde los eventos presenten una correlación lineal entre ambos parámetros graficados, ya que los agregados no presentan esta tendencia (Fig. 16).

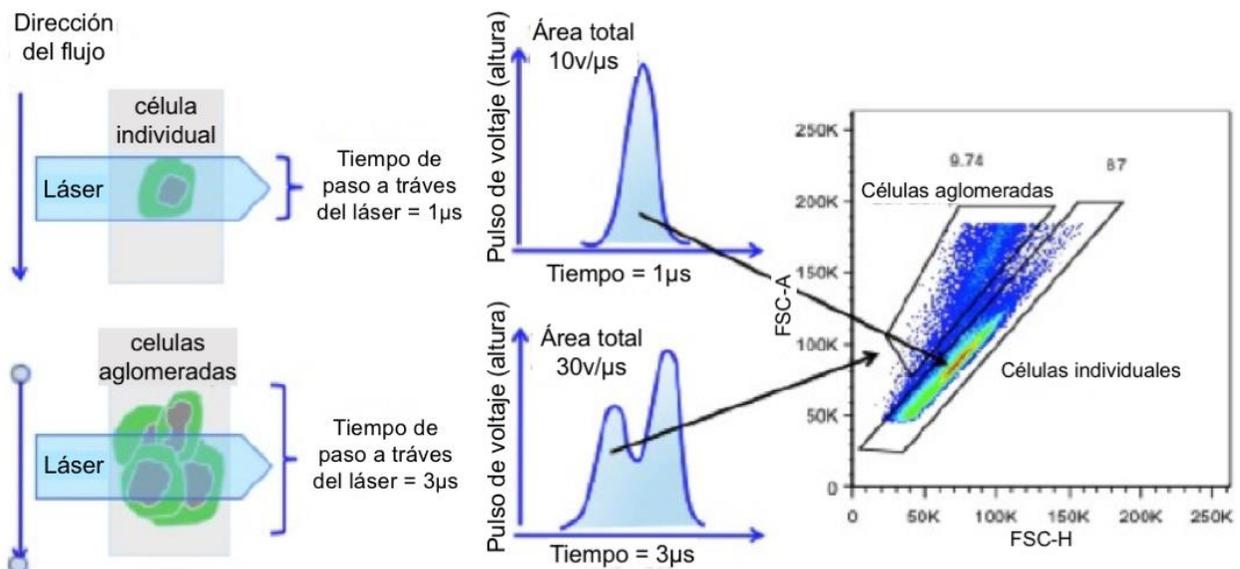


Fig. 16. Generación de agregados. Cuando una sola célula atraviesa el punto de interrogación y es iluminada por el láser se genera un pulso con un W, H y A determinado. H indica la intensidad de la señal y es proporcional al área del pulso. En el caso de un agregado celular,

tarda más tiempo en pasar por el punto de análisis teniendo una W y A más grande, mientras que H permanece igual. Imagen tomada de Bunshell, 2015.

Para la gráfica A vs H las células individuales se concentran para formar una línea recta con una pendiente de aproximadamente de 45 grados, y los agregados se visualizan alrededor de esta región. En el caso de la gráfica A vs W, las células individuales tienen una tendencia lineal con una mayor pendiente y los agregados se observan en una línea horizontal en la gráfica (Fig. 17).

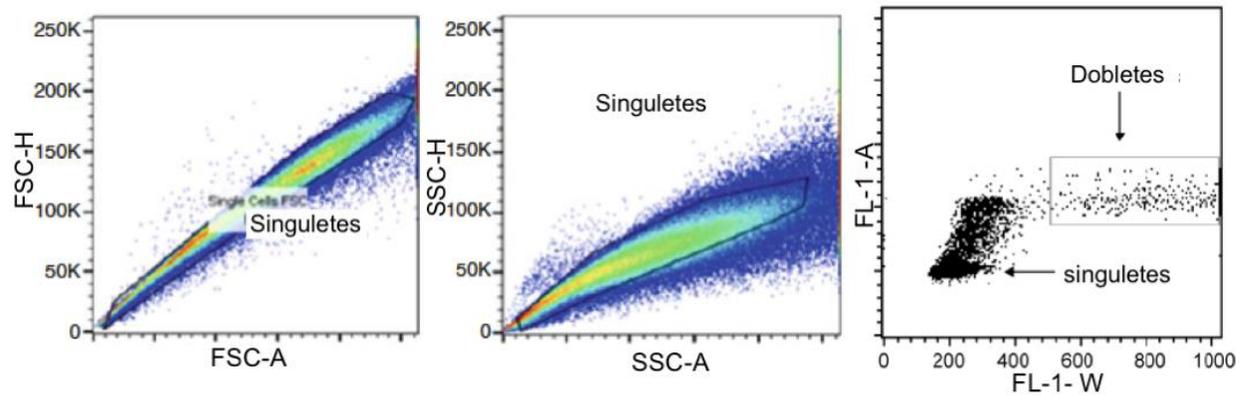


Fig. 17. Ejemplos de *gates* para discriminar células individuales de los agregados. En pseudocolor gráficas de A vs H en parámetros de tamaño y granularidad, seleccionando en el contorno las células individuales (singuletes). Gráfica de puntos muestra selección con parámetros de A vs W, en el contorno seleccionado se muestran los agregados (dobletes). Imágenes tomadas de Staats et al., 2019; Wersto et al., 2001.

De manera adicional se puede realizar una doble discriminación de las células individuales. Primero graficando en relación a FSC y posteriormente graficando en relación a SSC; con el fin de asegurar que los agregados se eliminaron adecuadamente y evitar que generen eventos falsos dobles positivos en las siguientes gráficas (Staats et al., 2019; Stadinski & Huseby, 2020).

c) Gate de viabilidad

Este tipo de *gate* se utiliza para asegurar que la respuesta que se va a estudiar corresponde a las células viables en la muestra. Las células muertas tienen una unión no específica a los anticuerpos, por lo que su eliminación del análisis permite

remover los eventos falsos positivos. Además, esta interferencia generada por las células muertas en condiciones sin estimulación puede complicar la distinción entre la población negativa y positiva (Price et al., 2021; Staats et al., 2019).

Para poder distinguir en este *gate* la población de interés, es necesario conocer cómo interactúa el fluorocromo utilizado con las células dependiendo de su fijación o no, ya que de esto dependerá la intensidad de la señal de fluorescencia observada que indique la viabilidad de las células. Sin embargo, suele distinguirse a las células viables por una señal negativa o muy baja hacia el fluorocromo utilizado graficando FSC-A vs fluorocromo de viabilidad (Fig. 18).

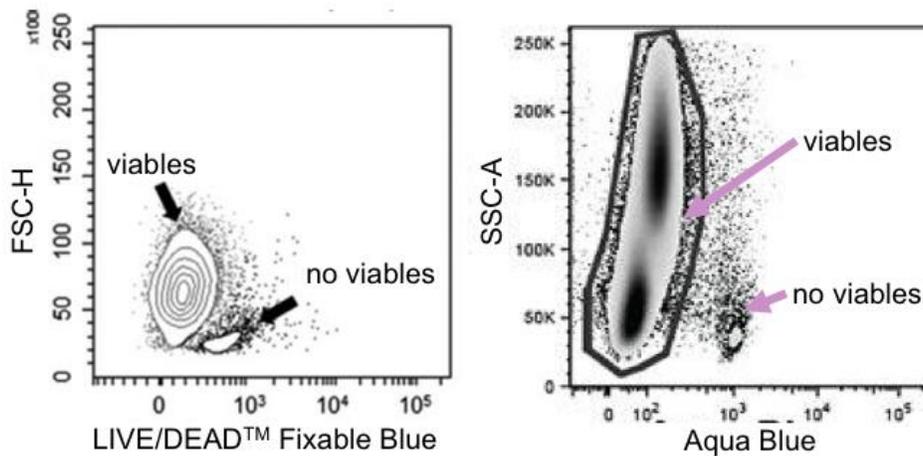


Fig. 18. Ejemplos de selección de células vivas en una *gate* de viabilidad graficando con FSC o SSC y el fluorocromo de viabilidad. Imágenes obtenidas de Cossarizza et al., 2019.

d) **Gate de tamaño y granularidad**

El objetivo de esta *gate* es seleccionar la población celular de interés cuando se tiene una muestra heterogénea de células, como es el caso de una muestra sanguínea. Para seleccionar la población se grafican los parámetros de SSC vs FSC. Este tipo de *gate* es muy utilizada para identificar poblaciones de células de sangre periférica ya que, dependiendo del tamaño y granularidad, las células se separan en regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos (Staats et al., 2019).

En caso de estudiar una línea celular, la gráfica SSC vs FSC permite seleccionar la región más homogénea y evitar incluir restos celulares o células muertas en el análisis (Fig. 19)

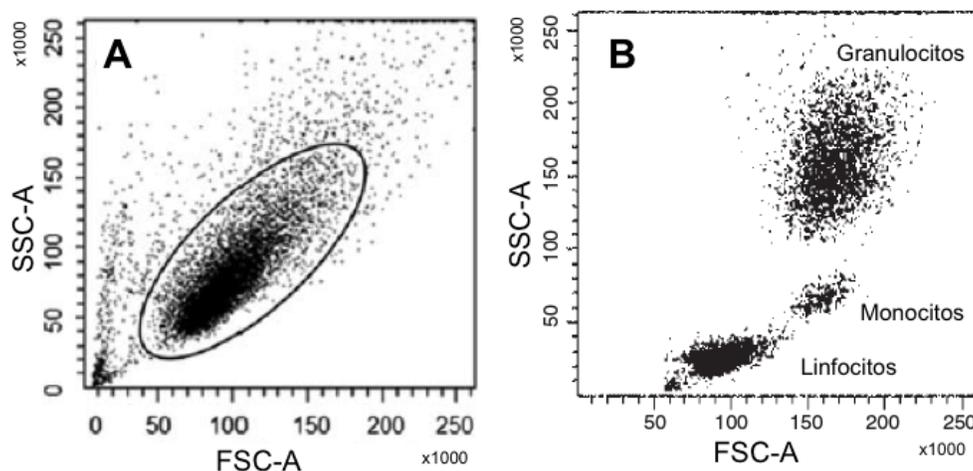


Fig. 19. Ejemplos de *gates* de tamaño y granularidad. A) Selección en línea celular de tumor para diferenciar de los restos celulares; B) Discriminación de diferentes poblaciones celulares con una gráfica de SSC vs FSC de una muestra. Imágenes tomadas de Cossarizza et al., 2019; Leach et al., 2013

e) **Gate de poblaciones específicas**

Las *gates* que se mencionaron anteriormente pueden aplicarse de manera general a la mayoría de los ensayos. Sin embargo, las *gates* de poblaciones específicas pueden variar dependiendo de los marcadores elegidos para el objetivo de estudio (Fig. 20). Es importante buscar información en la literatura relacionada con la expresión de los marcadores de las células que se pretenden evaluar, con el fin de seleccionar las regiones de interés con mayor facilidad.

Este tipo de *gates* pueden ayudar a identificar un tipo de subpoblación de interés dentro de una muestra heterogénea. Por ejemplo, la identificación de linfocitos T CD8⁺ en una muestra de sangre periférica; en donde después de seleccionar la población de linfocitos con la gráfica de tamaño y granularidad, la combinación de *gates* con los marcadores para CD3, CD4 y CD8 permite la identificación de la población positiva a CD8. Además de esto, en ensayos para evaluar funciones celulares como puede ser la activación tras la estimulación, la proliferación, el ciclo celular, entre otras; la selección de las regiones se basa en la comparación con los controles utilizados ya sea FMO o los controles positivos y negativos. Con ayuda de los controles es posible observar la región positiva que responde a las condiciones experimentales (Staats et al., 2019).

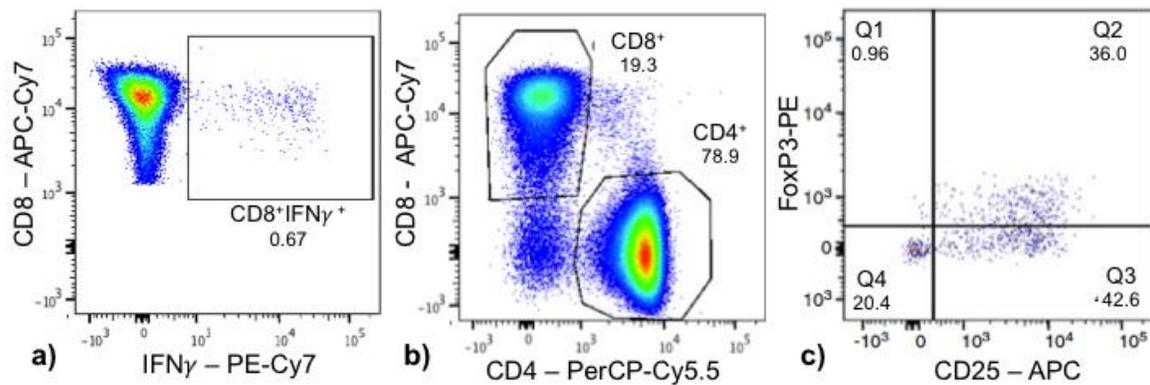


Fig. 20. Ejemplos de tipos de selecciones dependiendo de los marcadores: a) Evaluación de la producción de $\text{IFN}\gamma$ en linfocitos T CD8 graficando CD8 vs $\text{IFN}\gamma$; b) Diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T graficando CD8 vs CD4; c) Medición de la presencia de linfocitos T reguladores ($\text{FoxP3}^+\text{CD25}^+$) en una muestra sanguínea graficando FoxP3 vs CD25, ejemplo empleando cuadrantes. Imágenes tomadas de Price et al., 2021; Staats et al., 2019.

Ejemplo de análisis supervisado: Medición de la proliferación de linfocitos T CD4^+ y CD8^+

En el apartado anterior se definieron las principales gráficas utilizadas en un análisis supervisado de citometría de flujo. Sin embargo, la selección de regiones particulares especialmente de cada población a analizar depende del objetivo del ensayo y los diferentes marcadores utilizados para su propósito.

En este apartado se presenta un ejemplo de la estrategia de análisis con regiones realizado en un ensayo de proliferación de linfocitos T CD4^+ y CD8^+ de un donador sano.

El ensayo consistió en la obtención de células mononucleares y su estimulación con fitohemaglutinina (PHA), un agente que induce la proliferación de las células. PHA es un mitógeno policlonal que se une a glucoproteínas de la superficie de los linfocitos T que funcionan como receptores, generando la activación de factores de transcripción que promueven la proliferación (Abbas et al., 2012; Murphy et al., 2009)

El control positivo en este ensayo fue PHA a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$; por otro lado, el control negativo fueron las células sin estimular.

El panel utilizado para distinguir a los linfocitos T fue el siguiente: a) anti-CD3 eFluor 610, b) anti-CD4 PE, c) anti-CD8 APC-Cy7.

La adquisición se realizó en un FACSAria II usando los siguientes filtros: eFluor 610 (610/20 y 595LP), PE (576/26 y 556 LP), APC-Cy7 (780/60 y 735LP), *CellTrace™ Violet* (CTV) (450/40).

Para medir la proliferación se utilizó el colorante conocido como CTV (por su nombre en inglés *CellTrace™ Violet*), una molécula que es permeable a la membrana celular. Una vez dentro de las células, por acción de las esterasas intracelulares el CTV modifica su estructura y se une de manera covalente a los grupos aminos de las proteínas, lo que le permite mantenerse en el interior. Conforme la célula se divide el colorante se divide aproximadamente a la mitad entre las células, generando la dilución del colorante a través de las generaciones (Zolnierowicz et al., 2013).

La medición de la proliferación se midió al día tres y al día siete posterior a la estimulación y el análisis de los datos se hizo utilizando el programa de análisis FlowJo (versión 10.8.1, Becton Dickinson). Sin embargo, puede seguirse la misma selección de *gates* sin importar el software que se utilice.

Durante la fase de adquisición de los datos se realizaron los ajustes para el cálculo y aplicación de la correcta compensación, colocando los controles necesarios para su obtención; que son los tubos de cada fluorocromo individual y la muestra sin ninguna tinción. Como se mencionó anteriormente, la compensación es calculada de manera automática y se genera la matriz de compensación correspondiente (Fig. 21).

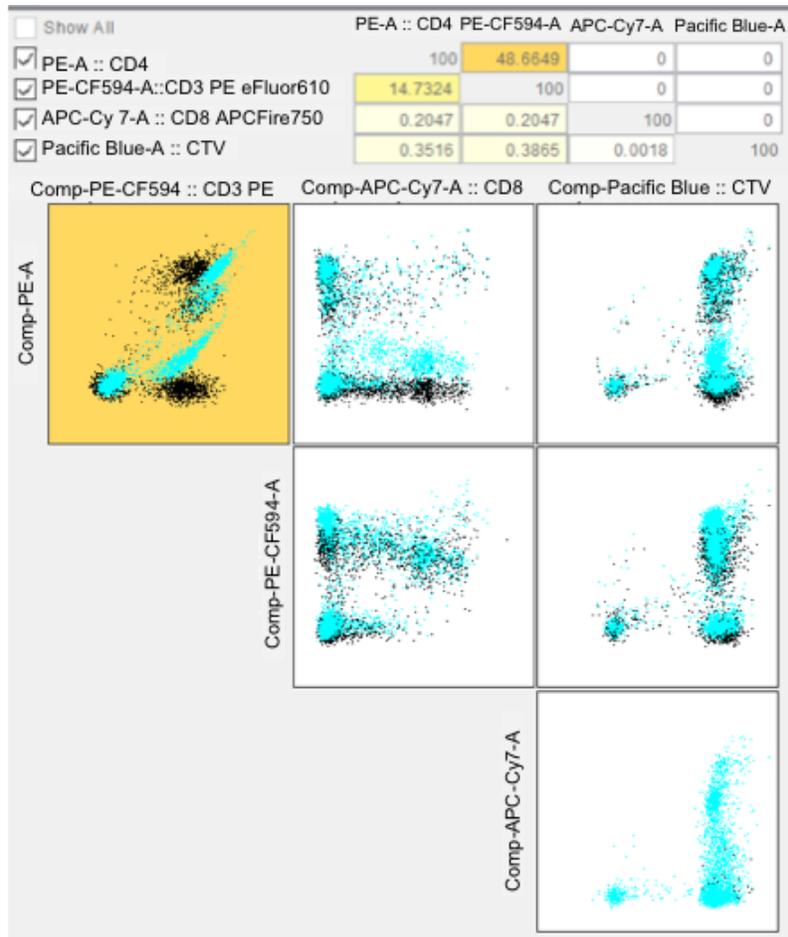


Fig. 21. Matriz de compensación y gráficas de muestra sin estimular. En azul se muestran los datos sin compensar y el negro aplicando la compensación en la muestra. Imagen tomada de la matriz generada en FlowJo a partir de la lectura de las muestras en el citómetro.

La figura 21 muestra la compensación adquirida de manera automática, la cual fue utilizada para todas las muestras experimentales. Se observa una mejora en la visualización de las gráficas de los datos compensados en comparación de aquellos sin compensar. El cambio más notorio ocurre en la gráfica Comp-PE-A vs Comp-PE-CF594 :: CD3 (PE eFluor610), en donde la tendencia diagonal de las poblaciones se ajusta para alinearlas horizontalmente en la gráfica. Así mismo, de manera general en las demás gráficas las poblaciones también sufren una ligera modificación para su alineación horizontal. Una vez verificada que la compensación es adecuada se procede a la adquisición de las muestras, Posteriormente, se realiza el análisis no supervisado de los datos como se explicación a continuación.

La estrategia de análisis que se siguió es la que se observa en la figura 22. Las consideraciones para la selección de las regiones importantes en cada *gate* se explican a continuación. Para realizar el análisis se adquirieron 10,000 eventos de la región CD8⁺.

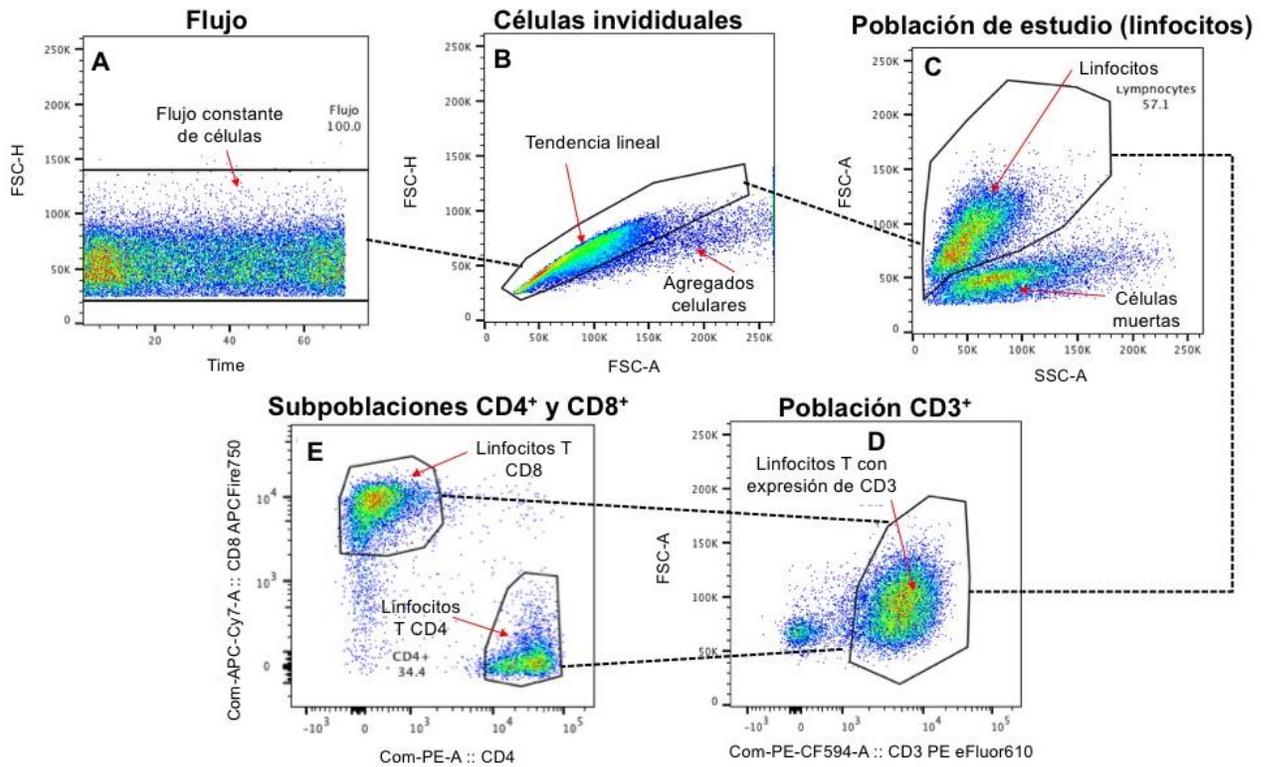


Fig. 22. Estrategia de análisis seguida hasta la obtención de la gráfica CD4 vs CD8 (A-E). Linfocitos estimulados con PHA (1 μ g/mL), al día 7 se realizó la adquisición de los datos en el citómetro para su análisis. Se muestra la selección de regiones para la definición de las diferentes *gates* que van desde lo general hasta la identificación de las subpoblaciones CD4 y CD8. Se siguió el mismo análisis para todas las muestras

-Flujo

Lo primero que se realizó fue buscar la región con flujo constante graficando FSC-H vs tiempo. En este caso toda la muestra que se registro en el equipo tiene un flujo constante de células durante todo el tiempo de adquisición, ya que no se observaron alteraciones en el flujo de adquisición como los ejemplos mostrados en la figura 15.

-Células individuales

A partir de la región de flujo constante se generó un nuevo *gate* para analizar las células individuales. La selección se realizó graficando el parámetro de tamaño (FSC-H vs FSC-A) y buscando una tendencia lineal en la gráfica. Aunque se observan dos tendencias lineales la línea inferior corresponde a células aglomeradas ya que, a pesar del aumento en el valor de FSC-A (área), FSC-H permanece en valores constantes.

-Población de estudio

Usando el *gate* de células individuales se graficó FSC-A vs SSC-A para determinar la población de interés, en este caso los linfocitos. En la gráfica, esta población es la región que presentó un mayor tamaño que se encuentra indicada en el contorno y la otra población corresponde a células muertas. Para identificar la población de estudio es importante conocer el procedimiento de preparación de la muestra para tener una idea de las posibles poblaciones encontradas en esta *gate*.

Debido a que se trata de una muestra de sangre periférica, se esperaría observar la presencia de monocitos en este tipo de gráfica. Sin embargo, durante el proceso de incubación durante el ensayo, los monocitos se adhieren con facilidad al fondo del pozo, por lo cual al extraer las células para realizar la tinción de superficie de los marcadores CD3, CD4 y CD8, la población de monocitos es muy baja para alcanzar a visualizarlos en la gráfica.

-Subpoblaciones

El primer marcador analizado corresponde a la identificación de linfocitos, ya que al graficar FSC-A vs CD3 se busca la población positiva a CD3, marcador característico de los linfocitos T. A partir de la región positiva se buscan las subpoblaciones generales de los linfocitos T, aquellas que son CD4+ y las CD8+ graficando estos dos marcadores.

A partir de la identificación de las subpoblaciones CD4 y CD8 en cada una se analiza la dilución de CTV

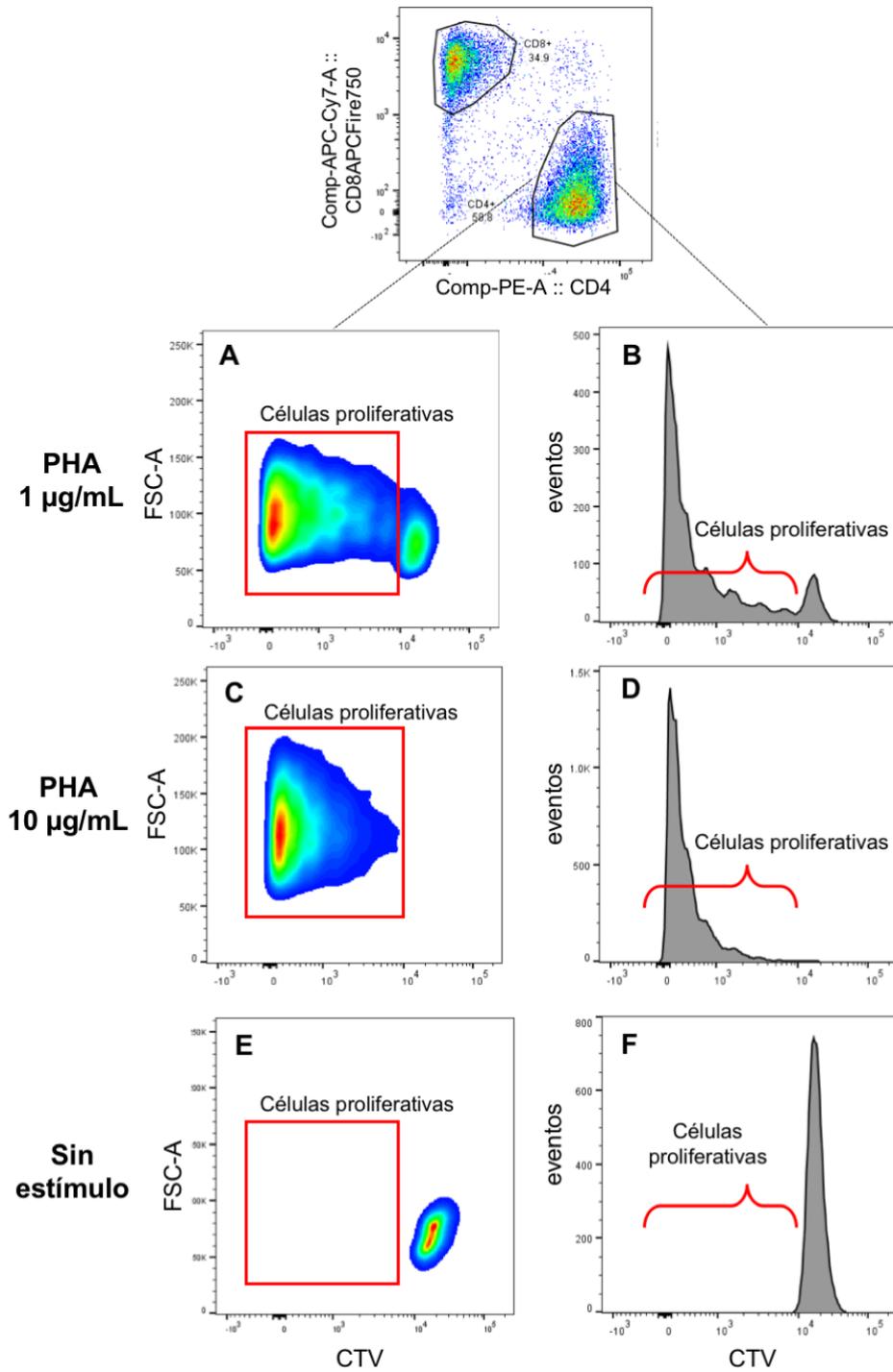


Fig. 23. Gráficos de la dilución de CTV en el caso de los linfocitos T CD4⁺ a la concentración experimental (1µg/mL), el control positivo (10µg/mL) y el control negativo (sin estímulo). A, C, E representación en pseudocolor de los ciclos de proliferación; B, D, F representación en histograma donde cada pico es un ciclo que proliferación

Como se muestra en la figura 23, la representación del fluorocromo para medir la proliferación puede ser en dos parámetros o uno solo. En la muestra estimulada con PHA $1\mu\text{g/mL}$ al día 7 se observan cinco ciclos de proliferación y un pico inicial. En el caso de los controles biológicos, en la muestra sin estimulación no se observan picos de proliferación, solo el pico inicial. El control de PHA $10\mu\text{g/mL}$ genera una alta proliferación y la mayoría de la población se desplaza a la izquierda de la gráfica.

Hasta esta gráfica corresponde la selección de *gates* manual realizado. Lo siguiente para continuar con el análisis del ensayo es ajustar un modelo matemático que permita el cálculo de los valores numéricos sobre el comportamiento de la proliferación y posteriormente realizar las pruebas estadísticas para generar un reporte.

Discusión

A lo largo de los diferentes apartados se describió de manera general diversos aspectos de la citometría, consultando diversas fuentes para recopilar la información. Este escrito pretende ser de gran utilidad, principalmente para los estudiantes que quieran conocer las generalidades teóricas de la citometría de flujo y puedan aplicarlas posteriormente en la práctica para responder a un fenómeno biológico usando esta técnica.

Para ello, es importante considerar las buenas prácticas de la citometría de flujo durante la pre-adquisición y post-adquisición de los datos. Dentro de la pre-adquisición, las buenas prácticas incluyen los principios de la técnica y el diseño del experimento; mientras que la post-adquisición se relaciona al análisis de los datos obtenidos.

Lo primero que debe comprenderse es el principio de la citometría de flujo, los sistemas que la componen, el concepto de fluorescencia, los tipos de fluorocromos que pueden utilizarse, las gráficas que se obtienen y finalmente el concepto de compensación propio de la técnica. Todo lo anterior contribuye a la generación de un panel.

El diseño de un panel, es un ejercicio característico de la citometría de flujo y conlleva que el usuario considere diversos aspectos. En este escrito se describieron algunas consideraciones para su diseño, destacando la importancia de conocer la mesa óptica del citómetro, es decir, la configuración óptica de láseres y filtros con la cuales cuenta el equipo donde se pretende realizar la adquisición de las muestras. Teniendo esta información es posible buscar los fluorocromos que son compatibles basándose en su espectro de excitación/emisión y limitándose a la disponibilidad comercial para adquirirlos. De manera simplificada, se puede decir que la mesa óptica direcciona gran parte del diseño del panel.

Existe una gran diversidad de equipos o citómetros de flujo en el mercado, además de esto, en un mismo equipo la mesa óptica puede variar, llegando a ser muy específica dependiendo del usuario. En consecuencia, el diseño del panel puede llegar a ser muy específico de un instrumento y por lo cual es muy importante conocer la configuración del equipo y su compatibilidad con un panel en caso de replicar alguno. Los datos de proliferación utilizados como ejemplo en este escrito se obtuvieron en un citómetro FACS Aria II con una configuración de tres láseres y 12 detectores distintos. Debido a la diversidad de equipos actuales en el mercado, generar una lista con todos los equipos disponibles sería complejo; sin embargo algunos de los citómetros que pueden encontrarse son los siguientes: Accuri™, Attune™, CyAn™, CyFlow™, LSR™ y los diferentes citómetros de la línea FACS™ (Picot et al., 2012)

Otro aspecto importante en el diseño del panel como parte de las buenas prácticas de la citometría es la titulación de los anticuerpos conjugados con el fluorocromo. El procedimiento de la titulación permite identificar la concentración ideal donde se observa la reacción antígeno-anticuerpo y en muchos casos disminuye la cantidad de reactivo utilizado.

Respecto a los controles necesarios para un experimento, se describieron tanto los controles propios de la citometría como los controles biológicos. En el caso de los controles biológicos dependiendo del fenómeno biológico a estudiar pueden tener una constitución diferente; sin embargo, deben cumplir con su función de comparar

y demostrar si existen cambios en las muestras experimentales del fenómeno estudiado.

A diferencia de los anteriores, los controles de citometría son un control de calidad muy importante. Permiten asegurar que los datos obtenidos corresponden a la presencia de las moléculas que se quieren estudiar y no a interferencias del equipo o de la propia fluorescencia en la que se basa esta técnica.

Los controles de compensación son fundamentales y deben realizarse cada vez que se hace una lectura en el citómetro, de preferencia con el mismo tipo de muestra con la que se pretende trabajar. Es importante realizar la compensación con los mismos fluorocromos que se planean utilizar en el ensayo. No es posible compensar con otros fluorocromos, aunque tengan un espectro de emisión/excitación similar. Por otro lado, el proceso de compensar las muestras es más sencillo cuando se realiza durante la adquisición de los datos que durante el análisis en los programas especializados.

Respecto a las buenas prácticas post-adquisición de los datos, se indicaron las bases para un análisis supervisado mediante la selección manual de *gates* y un ejemplo de esta selección continua.

Las limitaciones más importantes que tiene esta estrategia de análisis es el tiempo de análisis que puede llegar a ser largo dependiendo de la cantidad de datos, además de que la selección de las regiones es en una y dos dimensiones (máximo dos parámetros a la vez), por lo que mucha información multidimensional puede perderse. Finalmente, debido a que la selección de *gates* depende del operador y su experiencia en el uso de la citometría, los resultados que se obtienen son subjetivos y pueden variar considerablemente (Montante & Brinkman, 2019; Staats et al., 2019).

Por lo anterior, se han desarrollado nuevas técnicas de análisis que disminuyen la manipulación y la subjetividad del usuario.

Dentro de los análisis supervisados, SPICE es una buena alternativa al *gating* manual ya que permite visualizar una gran cantidad de datos y agruparlos en diferentes categorías. Sin embargo, para no depender de la estrategia de *gating*, se han desarrollado diferentes estrategias de análisis no supervisadas y principalmente

conocidas en inglés como *Probability of Binning*, *Frequency Difference Gating*, *Cluster analysis* y *Principal Component Analysis*. Cada aproximación tiene sus ventajas y desventajas, pero la elección para su uso depende del tipo y cantidad de datos con los que se cuenta (Lugli et al., 2010).

A pesar del avance en las estrategias de análisis que se pueden realizar para la citometría de flujo, el análisis de *gating* manual sigue siendo muy utilizado sobretodo para el análisis de pocos parámetros y en laboratorios que no pueden acceder a los paquetes de análisis complejos. Por lo cual contar con una guía para la selección de *gates* manual puede favorecer que en los experimentos se siga la selección de las mismas regiones. De esta forma los resultados pueden llegar a ser más homogéneos a pesar de la subjetividad del análisis, y favorecer el control de calidad entre experimentos.

Más allá de los avances en los métodos de análisis que han surgido, la citometría en sí ha evolucionado generando variaciones en la técnica como lo son la citometría de imagen, de masas y espectral. La citometría de imagen, además de los datos ya proporcionados en una citometría tradicional permite la obtención de imágenes de las células cuando atraviesan el punto de interrogación, algo muy útil para el estudio de las interacciones celulares (Doan et al., 2015)

La citometría de masa (conocida como CyTOF) combina el principio de la espectrometría de masas. En este caso las células son marcadas con anticuerpos acoplados con isótopos de metales pesados. De forma similar a la espectrometría de masas, la muestra es nebulizada generando la destrucción de la célula para su posterior lectura. Una de las ventajas en esta técnica es su precisión y se evita el problema del *spillover* (Spitzer & Nolan, 2016)

Como último ejemplo, en la citometría espectral, a diferencia de la citometría tradicional, se realiza la lectura de los eventos en todo el espectro, lo que genera que una huella espectral para cada uno de los eventos registrados, generando una señal específica para cada fluorocromo por lo que se corrige el problema del *spillover* y la compensación (Robinson, 2022)

Finalmente, debido a que la citometría es una técnica compleja, es de gran importancia que para aquellos que comienzan a trabajar con ella, consulten tanto el

diseño del panel como el análisis de datos con un experto en citometría de flujo. Esto permitirá dirigir de forma correcta el experimento y obtener resultados confiables. En este escrito se dio una introducción en español a la citometría, con el fin de que los estudiantes interesados en la misma comiencen a desarrollar una base teórica. Sin embargo, no es suficiente para realizar totalmente un experimento de citometría, para ello es necesario contar con el apoyo de un experto en el tema.

Conclusiones

-Se describieron los fundamentos de la funcionalidad de la citometría de flujo abarcando los sistemas que la componen, el principio de la fluorescencia en el que se basa, los tipos de gráficas que se obtienen, así como los valores que se pueden obtener de las mismas.

-Se realizó una descripción de los elementos más importantes a considerar para el diseño de un ensayo de citometría de flujo que va desde el diseño del panel de fluorocromos, el fenómeno de compensación propio de la técnica y los controles necesarios.

-En el caso del análisis de datos, se definieron las principales *gates* utilizadas para análisis supervisado de *gating* manual y mediante un ensayo de proliferación se ejemplificó la selección secuencial describiendo por qué se escogieron ciertas regiones y quedaron fueran otras poblaciones.

Referencia

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (7th ed.). Elsevier. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/unam/reader.action?docID=1723095&ppg=495>

abcam. (n.d.). *Fluorochrome chart – a guide to the most popular labels*. Retrieved November 16, 2022, from <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/fluorochrome-chart-a-complete-guide>

Adams, D. S., & Levin, M. (2012). General principles for measuring resting membrane potential and ion concentration using fluorescent bioelectricity

- reporters. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7(4), 385–397.
<https://doi.org/10.1101/pdb.top067710>
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 163–176). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Barbierato, M., Argentini, C., & Skaper, S. D. (2012). Indirect Immunofluorescence Staining of Cultured Neural Cells. In S. D. Skaper (Ed.), *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols* (Vol. 846, pp. 235–246). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_21
- Baumgarth, N., & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 243). www.elsevier.nl/locate/jim
- BioLegend-Blogs. (n.d.). *The Stain Index: What Is It and What Does It Tell You?* Retrieved May 16, 2022, from https://www.biolegend.com/en-us/blog/the-stain-index-what-is-it-and-what-does-it-tell-you?fbclid=IwAR0UonUJvwF_NVvXkwPffXi6IrlvssSui2ulPpGFyu3hazPnHBhiSCi72tQ
- Bunshell, T. (2015). *Flow Cytometry Controls Antibody Panels Data Analysis Cell Sorting Statistics*.
- Chantzoura, E., & Kaji, K. (2017). Flow Cytometry. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 173–189). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00010-2>
- Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L. N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C. T., Bari, S., ... Zychlinsky, A. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology*, 49(10), 1457–1973.
<https://doi.org/10.1002/eji.201970107>

- Dey, P. (2018). Fluorescence and Confocal Microscope: Basic Principles and Applications in Pathology. In *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* (pp. 245–252). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_25
- Doan, H., Chinn, G. M., & Jahan-Tigh, R. R. (2015). Flow Cytometry II: Mass and Imaging Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(9), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.263>
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*, 69(1), 4.3.1-4.3.7. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s69>
- Fletez-Brant, K., Špidlen, J., Brinkman, R. R., Roederer, M., & Chattopadhyay, P. K. (2016). flowClean: Automated identification and removal of fluorescence anomalies in flow cytometry data. *Cytometry Part A*, 89(5), 461–471. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22837>
- Flores-Gonzalez, J., Cancino-Díaz, J. C., & Chavez-Galan, L. (2020). Flow cytometry: From experimental design to its application in the diagnosis and monitoring of respiratory diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228830>
- Flores-Montero, J., Kalina, T., Corral-Mateos, A., Sanoja-Flores, L., Pérez-Andrés, M., Martín-Ayuso, M., Sedek, L., Rejlova, K., Mayado, A., Fernández, P., van der Velden, V., Bottcher, S., van Dongen, J. J. M., & Orfao, A. (2019). Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 475(112618), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.06.009>
- FlowJo. (n.d.). *Contour Plots*. Retrieved June 16, 2022, from <https://docs.flowjo.com/flowjo/graphs-and-gating/data-visualization-and-display/gw-contours/>
- Givan, A. (2011). Flow Cytometry: An Introduction. In T. S. Hawley & R. G. Hawley (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (3rd ed., Vol. 699, pp. 1–30). Humana Press. www.springer.com/series/7651

- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunology*, 7(7), 681–685. www.TreeStar.com
- Holmberg-Thyden, S., Grønbaek, K., Gang, A. O., el Fassi, D., & Hadrup, S. R. (2021). A user's guide to multicolor flow cytometry panels for comprehensive immune profiling. *Analytical Biochemistry*, 627. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114210>
- Leach, M., Drummond, M., & Doig, A. (2013). Principles of Flow Cytometry. In *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis* (1st ed., pp. 3–19). John Wiley & Sons.
- Longobardi, A. (2001). *Flow Cytometry First Principles* (Wiley-Liss, Vol. 1).
- Lugli, E., Roederer, M., & Cossarizza, A. (2010). Data analysis in flow cytometry: The future just started. In *Cytometry Part A* (Vol. 77, Issue 7, pp. 705–713). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20901>
- Macey, M. G. (2007). Principles of Flow Cytometry. In M. G. Macey (Ed.), *Flow Cytometry: Principles and Applications* (pp. 1–16). Humana Press.
- Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K., & Jain, P. (2017). Basic multicolor flow cytometry. *Current Protocols in Immunology*, 2017, 5.4.1-5.4.38. <https://doi.org/10.1002/cpim.26>
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 191–200). <https://doi.org/10.1038/nri3158>
- Maecker, H. T., & Trotter, J. (2006). Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry Part A*, 69(9), 1037–1042. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20333>
- Mair, F., & Tyznik, A. J. (2019). High-Dimensional Immunophenotyping with Fluorescence-Based Cytometry: A Practical Guidebook. In P. J. McCoy (Ed.), *Immunophenotyping: Methods and Protocols* (Vol. 2032, pp. 1–30). Humana Press. <http://www.springer.com/series/7651>

- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Montante, S., & Brinkman, R. R. (2019). Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *International Journal of Laboratory Hematology*, 41(S1), 56–62. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13016>
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunobiología de Janeway* (7th ed.). McGrawHill.
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. In *Cytotechnology* (Vol. 64, Issue 2, pp. 109–130). <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- Prado-Garcia, H., Campa-Higareda, A., & Romero-Garcia, S. (2020). Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00807>
- Price, L. S., Adamow, M., Attig, S., Fecci, P., Norberg, P., Reap, E., Janetzki, S., & McNeil, L. K. (2021). Gating Harmonization Guidelines for Intracellular Cytokine Staining Validated in Second International Multiconsortia Proficiency Panel Conducted by Cancer Immunotherapy Consortium (CIC/CRI). *Cytometry Part A*, 99(1), 107–116. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24244>
- Robinson, J. P. (2022). Flow cytometry: past and future. *BioTechniques*, 72(4), 159–169. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0005>
- Roederer, M., Darzynkiewicz, Z., & Parks, D. R. (2004). Guidelines for the Presentation of Flow Cytometric Data. In *Methods in Cell Biology* (Elsevier, Vol. 75, pp. 241–256).
- Rothe, G. (2009). Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry. In U. Sack, A. Tárnok, & G. Rothe (Eds.), *Cellular Diagnostics. Basic, Methods and clinical Applications of Flow Cytometry* (pp. 53–88). Karger.

- Shapiro, H. M. (2003). 5. Data Analysis. In *Practical Flow Cytometry* (4th ed., pp. 225–256). Wiley-Liss.
- Spitzer, M. H., & Nolan, G. P. (2016). Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. In *Cell* (Vol. 165, Issue 4, pp. 780–791). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>
- Staats, J., Divekar, A., McCoy, P. J., & Maecker, H. T. (2019). Guidelines for Gating Flow Cytometry Data for Immunological Assay. In P. J. McCoy (Ed.), *Immunophenotyping: Methods and Protocols* (Vol. 2032, pp. 81–104). Humana Press. <http://www.springer.com/series/7651>
- Stadinski, B. D., & Huseby, E. S. (2020). How to Prevent yourself from Seeing Double. In *Cytometry Part A* (Vol. 97, Issue 11, pp. 1102–1104). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24045>
- Sun, J., Kroeger, J. L., & Markowitz, J. (2021). Introduction to multiparametric flow cytometry and analysis of high-dimensional data. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2194, pp. 239–253). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0849-4_13
- Telford, W. G., Hawley, T., Subach, F., Verkhusha, V., & Hawley, R. G. (2012). Flow cytometry of fluorescent proteins. In *Methods* (Vol. 57, Issue 3, pp. 318–330). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.003>
- Verschoor, C. P., Lelic, A., Bramson, J. L., & Bowdish, D. M. E. (2015). An introduction to automated flow cytometry gating tools and their implementation. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00380>
- Wang, S., & Brinkman, R. R. (2019). Data-driven flow cytometry analysis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1989, pp. 245–265). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9454-0_16
- Wersto, R. P., Chrest, F. J., Leary, J. F., Morris, C., Stetler-Stevenson, M., Gabrielson, E., & Wersto, R. (2001). Doublet Discrimination in DNA Cell-Cycle Analysis. In *Communications in Clinical Cytometry* (Vol. 46).
- Zolnierowicz, J., Ambrozek-Latecka, M., Kawiak, J., Wasilewska, D., & Hoser, G. (2013). Monitoring cell proliferation in vitro with different cellular

fluorescent dyes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 51(3), 193–200.
<https://doi.org/10.5603/FHC.2013.0027>