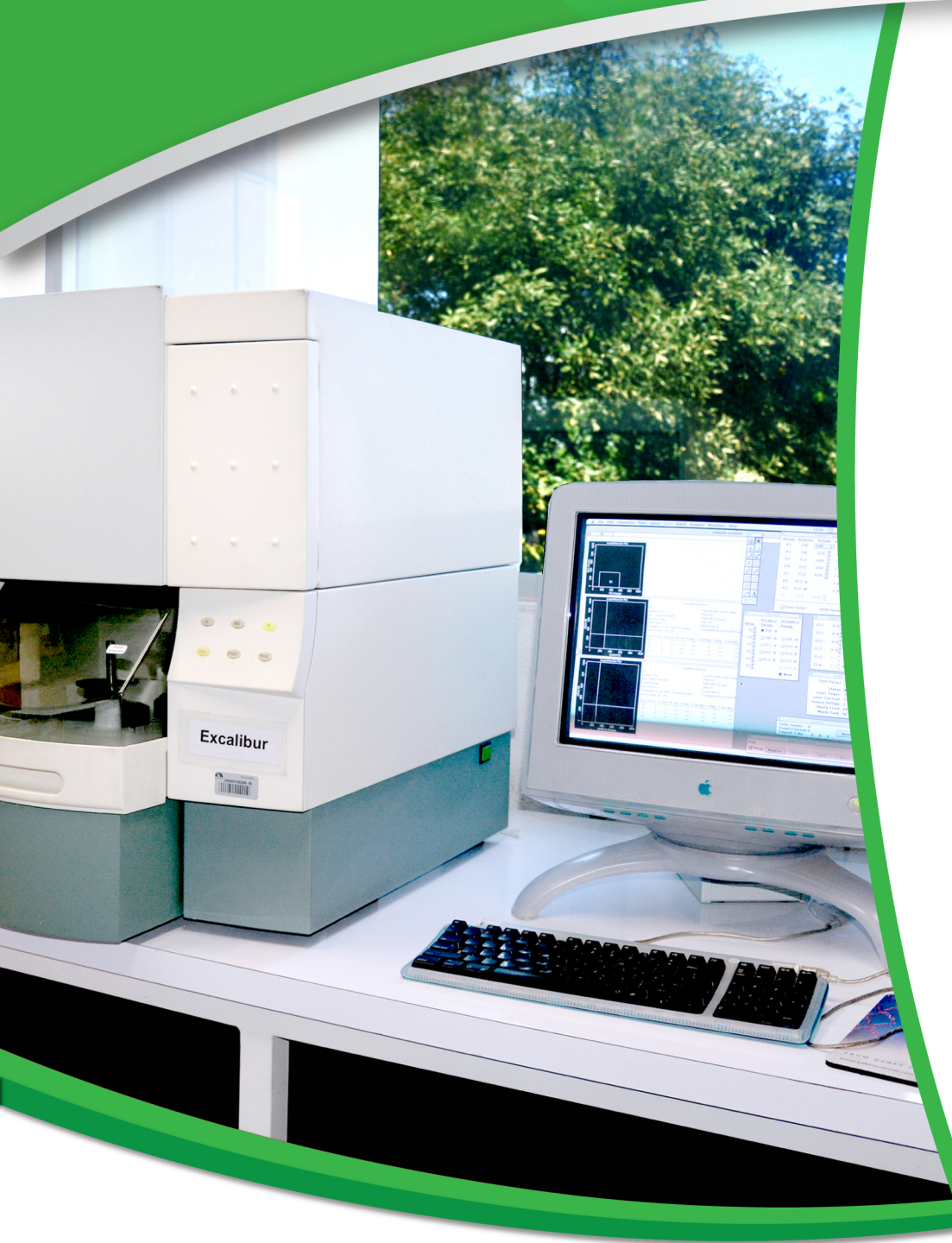




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio Citometría de Flujo



Edith Cortés Barberena

Elsa Cervantes Ríos

Alda Rocío Ortiz Muñiz



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dr. Edmundo Bonilla González
Jefe del Departamento de Ciencias de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. Michoacán y La purísima
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Introducción	5
Conceptos Básicos de la Citometría de Flujo	7
Sistemas de un citómetro de flujo	9
Seguridad en el laboratorio	17
Términos en citometría de flujo.	25
Práctica 1. Demostración del citómetro de flujo	27
Práctica 2. Calibración del equipo y optimización.	37
Práctica 3. Separación de células por citometría de flujo	45
Práctica 4. Análisis del contenido de ADN	55
Práctica 5. Determinación de la viabilidad celular	65
Práctica 6. Inmunofenotipo.	73
Práctica 7. Método alternativo para el análisis del contenido de ADN.	83
Abreviaturas	91
Vocabulario	93
Bibliografía complementaria	95
Páginas electrónicas recomendadas	97

Introducción

La citometría de flujo es una tecnología que permite evaluar diferentes características simultáneamente de una célula o partícula en suspensión, como son el tamaño y la complejidad interna, así como, algún componente celular o la función marcada con fluorescencia. Aunque la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han propiciado, en la última década, un rápido incremento en su uso, tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos

El presente manual fue elaborado para apoyar los cursos de licenciatura y posgrado, sobre citometría de flujo, que se imparten en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Tiene como objetivo introducir al alumno en el manejo del citómetro de flujo, por medio de la realización de prácticas para la evaluación de diversas características de las células por medio de esta tecnología.

Las prácticas propuestas son factibles de realizar, fueron elaboradas tomando en consideración los recursos disponibles para su desarrollo con los citómetros de flujo con los que cuenta la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

En la primera parte del presente manual, se exponen los conceptos básicos de la citometría de flujo. A continuación se incluye un apartado en el que se presentan las medidas de seguridad esenciales para el trabajo en el laboratorio. En seguida se incluyen las prácticas.

La práctica 1 tiene como objetivo la demostración del citómetro de flujo, en ella se explican sus componentes principales y el funcionamiento general del equipo. En la práctica 2 se lleva a cabo el proceso para la calibración y optimización del equipo. En la práctica 3 se enseña el método para la separación de células por medio de citometría de flujo. En la práctica 4 se efectúa el análisis del contenido de ADN y se identifican a las células en las diferentes fases del ciclo celular. La práctica 5 tiene como objetivo determinar la viabilidad celular de una muestra biológica utilizando citometría de flujo. En La práctica 6 se determina el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de leucocitos y linfocitos en sangre periférica de humano. Y, en la práctica 7 se desarrolla un método alternativo para cuantificar al ADN.

Por último se incluye bibliografía complementaria para que los alumnos puedan ampliar los conocimientos que les resulten más atractivos.

Por medio de la realización de estos protocolos, se demuestra que la citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular.

Conceptos Básicos de la Citometría de Flujo

En esta sección del manual se definen los conceptos de la citometría de flujo (CF), y los sistemas que integran un citómetro de flujo. Al final se mencionan algunas aplicaciones actuales de esta tecnología para ilustrar su utilidad.

La citometría se aboca a la cuantificación de parámetros celulares. La Citometría de flujo es una tecnología que permite medir características de las células, mientras éstas pasan en suspensión en una corriente de fluido.

La citometría es una disciplina orientada tecnológicamente a la determinación multiparamétrica de elementos celulares tanto morfológicos como moleculares (Shapiro, 2003). En la CF las partículas o células en suspensión viajan a través de una corriente de fluido hasta el punto donde la luz, en general un láser las intercepta y se generan señales de cada parámetro. Un separador de células, conocido en inglés como "cell sorter" o "flow sorter", tiene dispositivos, ya sea mecánicos o eléctricos, que son capaces de seleccionar y coleccionar células (Shapiro, 2003, Barrera y cols, 2004).

Se conoce como **parámetro** a la característica física o química de una célula que puede ayudar a identificarla dentro de una población celular (Shapiro, 2003). Por medio de CF se pueden analizar numerosos parámetros en una célula, dentro de ellos están: tamaño y complejidad interna (relacionada con las membranas internas); receptores de superficie; proteínas intracelulares; cambios en la membrana celular; ácidos nucleicos y síntesis de ADN; metabolismo celular etc.

La capacidad de medir simultáneamente múltiples parámetros celulares se debe a la detección de la desviación de luz, permitiendo así obtener el tamaño y complejidad, así como la **fluorescencia** proveniente de cualquier componente celular o función, marcada con un colorante fluorescente o **fluorocromo** sensible a la fuente de luz. (Barrera y cols., 2004; Ortiz y cols., 2006).

Aunque la CF es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han propiciado un rápido incremento en su uso, tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos. Dentro de los campos en los que es notorio el uso de esta tecnología están: inmunología, genética, botánica, ecología acuática, etc.

Actualmente existen numerosas aplicaciones de esta tecnología, sin embargo, siguen apareciendo nuevas, lo que demuestra su amplia capacidad. Además, las compañías fabricantes se han esforzado en desarrollar mejoras técnicas en los equipos, así como en los programas de cómputo (software) para ampliar las capacidades y confiabilidad de los equipos. El citómetro de flujo está constituido por diversos sistemas los cuales se describen brevemente a continuación. La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Ha sido empleada en diferentes disciplinas tanto en investigación básica como clínica.

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Ha sido empleada en diferentes disciplinas tanto en investigación básica como clínica.

Sistemas de un citómetro de flujo

Un citómetro de flujo está compuesto por tres principales sistemas:

- Fluidos: Para introducir y alinear a las células para ser medidas.
- Ópticos: Una fuente de excitación y colección óptica para generar y coleccionar las señales de luz
- Electrónicos: Conversión de señales ópticas a señales electrónicas.

Estos tres sistemas sumados con los avances en diseño de programas de computación permiten el análisis de múltiples parámetros de una célula, así como un gran número de ellas (Ormerod, 2008). La **Figura 1** muestra un esquema general de los tres sistemas que integran un citómetro de flujo.

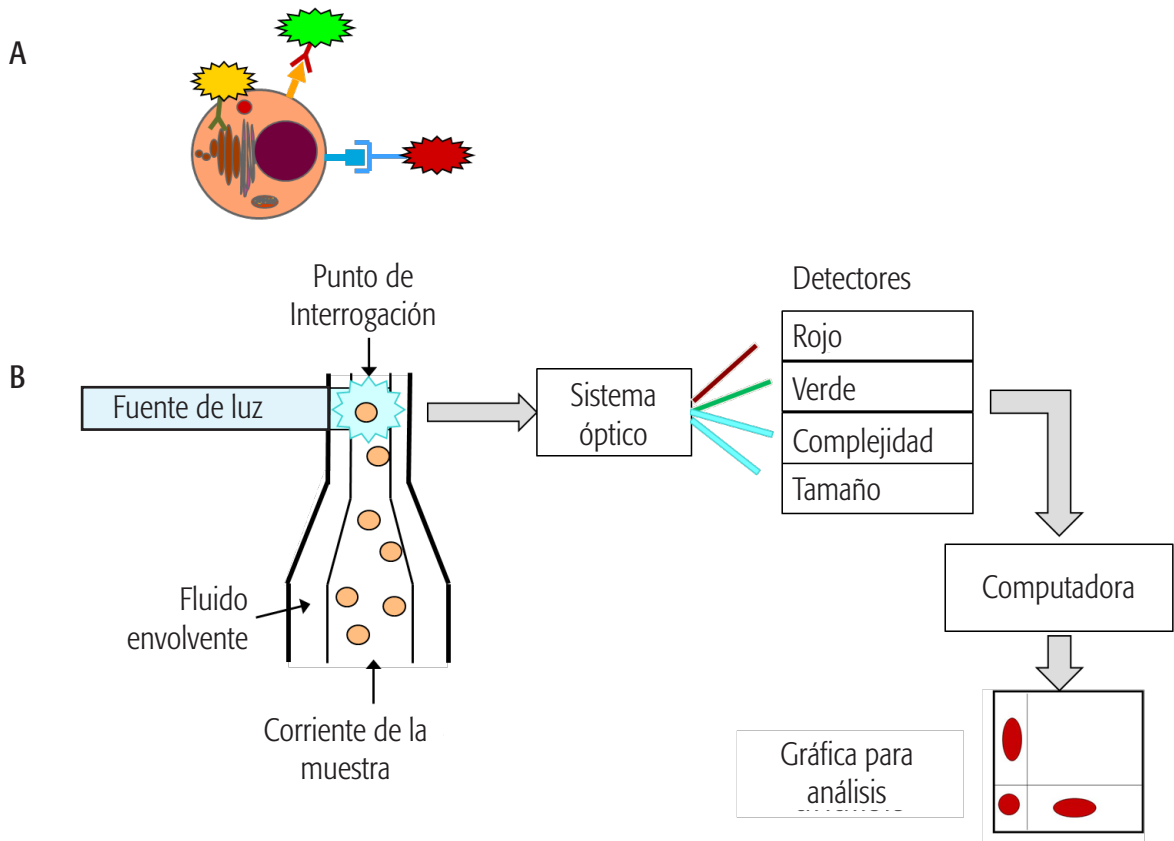


Figura 1. Vista general de la citometría de flujo. A. Se representa a una célula con receptores de membrana y membranas internas, que sumados a su tamaño le dan características propias. B. Se representa de manera general el análisis que se realiza de una célula con ayuda de la citometría de flujo.

Sistema de fluidos

El sistema de fluidos se encarga de transportar y alinear a las partículas dentro de una celda o cámara de flujo en la cual inciden con una fuente de luz para medir las diferentes características de las partículas (Macey, 2010). Es importante señalar que las células o partículas deben estar en suspensión para que el sistema de fluidos cumpla con su función.

Al mecanismo para alineación de células también se le conoce como enfoque hidrodinámico y consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente, conocida también como fluido envolvente y este puede ser agua o un amortiguador de fosfatos. El fluido envolvente mejora la precisión con la que las células se colocan en la región de observación del citómetro, ya que se restringe a las células en el centro del flujo de la muestra y reduce la posibilidad de obstrucciones del sistema (Shapiro, 2003). Si el sistema no se perturba, el fluido envolvente y la corriente de la muestra no se mezclan y se logra que las células viajen en “fila india” en la cámara de flujo (Ormerod, 2008; Macey, 2010).

Existen dos tipos principales de cámaras de flujo: la cámara abierta y la cerrada. De hecho, en el diseño de cámaras cerradas hay dos subtipos (**Figura 2**). Las cámaras cerradas están hechas con paredes de cuarzo, las cuales permiten el paso suave, continuo y no pulsátil de la muestra. El punto de interrogación, es decir, el lugar donde la luz incide en la muestra, se encuentra dentro de la cámara (Ormerod, 2008).

La cámara abierta (**Figura 2B**), es utilizada en los citómetros que hacen separación por deflexión electrostática (Dean y Hoffman, 2007). En este tipo de cámara, se genera suficiente presión para que el fluido que contiene la muestra salga en un chorro fuera de la cámara con las células enfocadas (Hoffman, 2008). A este tipo de flujo se le conoce como chorro en aire o por las palabras en inglés “jet in air”. El punto de interrogación de la muestra se encuentra inmediatamente después del orificio de salida (Hoffman, 2008; Ormerod, 2008). Existen otros tipos de sistemas de fluidos que usan estrategias diferentes para alinear a las células en la cámara de flujo: bombas peristálticas, enfoque acústico y celda de flujo microcapilar.

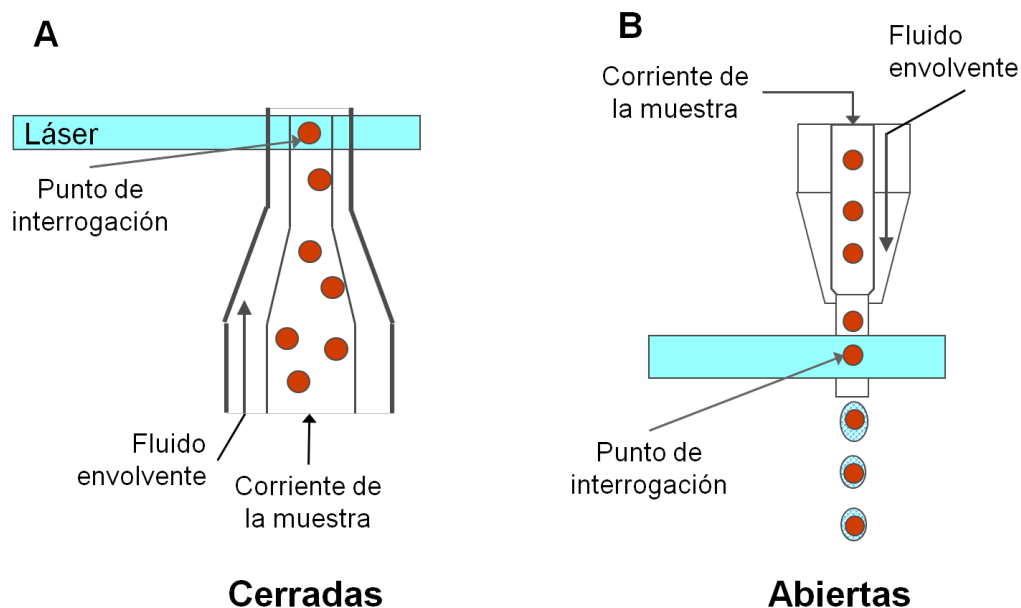


Figura 2. En este esquema se muestran la cámara de flujo y las flechas señalan la dirección de los fluidos.

Sistema óptico

Este sistema se compone de la óptica de excitación y consiste en una fuente de luz que ilumina las partículas o células teñidas o sin teñir y la de colección que se encarga de la detección de la desviación de luz y fluorescencias (Hoffman, 2008). La fuente de luz puede ser diferente en cada modelo de citómetro, como lámparas de arco, LED o láser (Shapiro y Telford, 2009). El láser más común en los citómetros actuales de diferentes fabricantes es uno de argón, enfriado por aire, que produce una luz azul de 488nm, pero también existen instrumentos con un láser o más adicionales (Shapiro y Telford, 2009; Macey, 2010).

La membrana celular produce una desviación de luz con ángulo pequeño de 0.5 a 5° con respecto al eje del láser, conocida como dispersión frontal o FSC, por las siglas en inglés de "forward scatter", y ésta genera un cono que refleja el tamaño de la célula (**Figura 3**). Por otro lado, la luz que se interna dentro de la célula, se encuentra con las membranas internas y se desvía en cualquier ángulo. La luz dispersada por membranas internas se conoce como dispersión lateral o SSC (side scatter) y se toma en cuenta la que tiene un ángulo de aproximadamente 90°. Entre más membranas internas más dispersión lateral se genera (Ormerod, 2008).

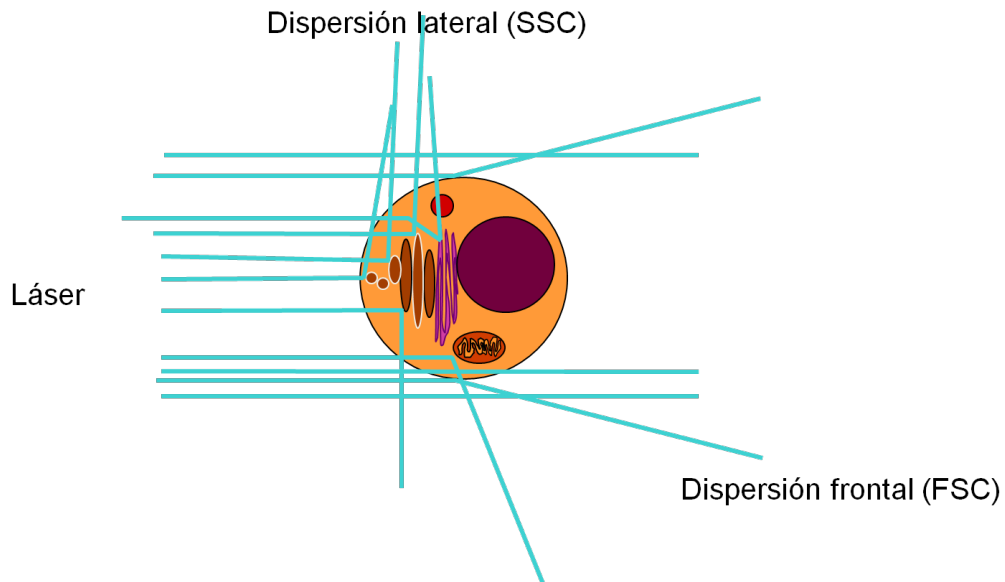
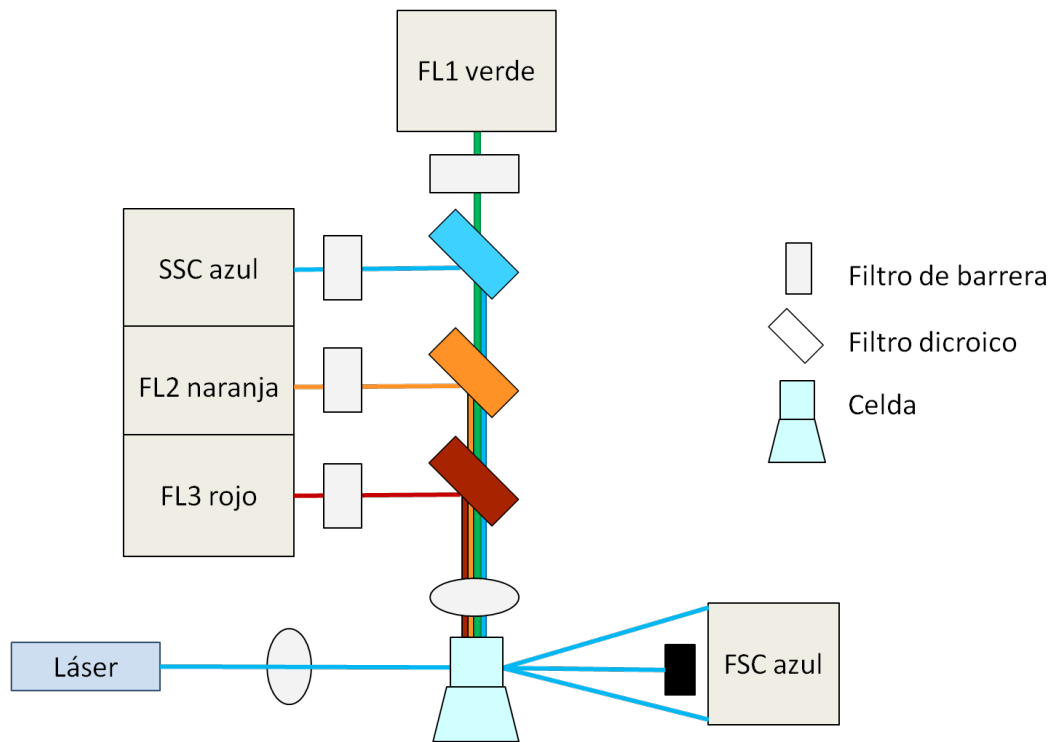


Figura 3. Dispersión de luz. El tamaño de la célula se obtiene de la dispersión frontal, ya que se genera por la luz que incide sobre la membrana celular. La complejidad interna se debe a la desviación de la luz que se genera al incidir sobre las membranas internas de la célula.

La óptica de colección consiste en lentes de colección y filtros ópticos. Un lente de colección se encarga de dirigir la luz desviada frontalmente por la célula (FSC, por sus siglas en inglés) hacia el detector correspondiente, mientras que otro lente se encarga de dirigir la luz desviada lateralmente (SSC, por sus siglas en inglés) y la fluorescencia hacia los filtros ópticos (Macey, 2010).

Los filtros dicróicos permiten el paso de luz en un intervalo de longitud de onda y refleja la que esté fuera de ese intervalo (Shapiro, 2003). En la figura 4 se muestran los diferentes tipos de filtros: Los de longitud amplia (longpass) permiten la transmisión de luz de longitud de onda mayor mientras que refleja la de menor longitud de onda; los de longitud corta (shortpass) permite el paso de la luz de longitud de onda corta. Los filtros que en este texto llamaremos de intervalo (bandpass), permiten solamente el paso de longitudes de onda en un intervalo (o banda) y el resto lo reflejan (Hoffman, 2008).

El uso de diferentes filtros dicróicos permite que las señales luminosas se dirijan a los detectores adecuados. Se han utilizado diferentes arreglos geométricos en los componentes del sistema óptico para la lectura de dos o más de 10 fluorescencias según el modelo de citómetro (Macey, 2010; Hoffman, 2008). En la figura 4 se muestra un arreglo del sistema óptico que fue adoptado por varios modelos de citómetros (Ormerod, 2008). Los citómetros FASCan y FACSCalibur tienen un arreglo muy similar.



Esquema general del arreglo del sistema óptico.

Sistema electrónico

Las señales luminosas generadas cuando el láser incide en la célula deben traducirse a señales electrónicas, y para lograr este propósito se requieren sensores sensibles a la luz capaces de esta conversión de las señales. (Dean y Hoffman, 2007). Los dos tipos principales de sensores luminosos son los fotodiodos de silicón y los fotomultiplicadores (Hoffman, 2008).

Los fotodiodos de silicón son utilizados principalmente para detectar la extinción y la desviación de luz frontal, es decir FSC, puesto que la señal es alta en energía. Este fotodetector se encuentra en el mismo eje del láser y se coloca un filtro que obstruye y refleja la luz que atraviesa la muestra o se emite directamente el láser, y de esta manera se evita que interfiera con la señal de FSC y dañe el fotodiodo (Shapiro, 2003).

Los fotomultiplicadores, o PMT por sus siglas en inglés, son requeridos para captar señales más débiles, como la fluorescencia y la dispersión lateral (SSC) (Dean y Hoffman, 2007). El PMT es un tubo de vacío que capta la luz por un fotocátodo y libera electrones en el interior del tubo que se amplifican en número con ayuda de un gradiente de voltaje generados por una serie de electrodos llamados dínodos, llegan al ánodo en una señal amplificada. El suministro de alto voltaje para el PMT hace que el costo sea mayor que un fotodiodo (Shapiro, 2003).

Los electrones que se generan en los detectores cuando captan los fotones, se convierten en una corriente eléctrica que es proporcional a la señal detectada. Este pulso es amplificado aplicando un mayor voltaje, en escala lineal o logarítmica. Los amplificadores lineales son útiles para el estudio de poblaciones celulares con un intervalo de intensidad de señal muy estrecho, los estudios del contenido de ADN son un ejemplo. Por otro lado, los amplificadores logarítmicos son mejores para las poblaciones con un amplio intervalo de intensidades, de dos a tres décadas, y como ejemplo tenemos la identificación por inmunofluorescencia de células marcadas o no marcadas (Shapiro, 2003; Hoffman, 2008).

Un convertidor análogo-digital (ADC, por su nombre en inglés analog-to-digital converter) transforma el pulso de voltaje análogo de 0 a 1000 mV en un número que representa un canal, en una escala de 0 a 1024 canales. Estos valores se transfieren a la computadora por medio de una interfaz de entrada y salida de propósito general (GPIO, por sus singlas en inglés) y se pueden representar en una gráfica con ayuda de un programa computacional (Hoffman, 2008).

Fluorescencia

Las moléculas fluorescentes, también conocidas como fluorocromos, tienen la característica de poseer dobles enlaces conjugados. Los electrones que se encuentran en estos enlaces son capaces de absorber energía luminosa, ya que al estar en enlace pi, se excitan de manera más fácil a orbitales de mayor energía. La energía absorbida se emite cuando el electrón regresa a su estado inicial, pero parte lo hace en forma de calor y como consecuencia, la luz emitida es de mayor longitud de onda y menor energía. Cada fluorocromo absorbe en una longitud de onda específica de luz, y emite en otra longitud también característica como se muestra en el Cuadro 1 (Shapiro, 2003; McCarthy, 2010).

Fluorocromos	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Láser
DAPI	345	455	Ultravioleta de Kriptón (351-356 nm)
Cascade Blue	395	420	Violeta de Kriptón (407 nm)
FITC	495	519	Azul de argón(488nm)
PE	480, 565	578	
PerCP	490	675	
Yoduro de propidio	493	617	
APC	650	660	Rojo de diodo (635nm)

Cuadro 1. Algunos fluorocromos, longitud de onda de excitación y de emisión y el tipo de láser que se requiere para su detección.

Existen recomendaciones para una selección adecuada de fluorocromos con base en sus características (Ormerod, 2008, McCarthy, 2010). A continuación se enlistan las más importantes:

- El espectro de excitación coincide con la longitud de onda de los láseres disponibles en el citómetro.
- Tienen intensidades de fluorescencia altas al asociarse a las células (brillo).
- Muestran poca superposición en los espectros de emisión entre ellos.
- Se puedan unir fácilmente a estructuras químicas.

Compensación

Los fluorocromos muestran un espectro de emisión que puede superponerse en el espectro de emisión de otro fluorocromo (Macey, 2010), como se puede apreciar en la **Figura 5**. Si este efecto no se corrige la fluorescencia de FITC, por ejemplo, hace una contribución de señal al PMT correspondiente a un fluorocromo con un espectro de emisión adyacente, como el PE. La compensación es el proceso matemático por el cual se elimina la superposición entre fluorocromos (Tung y cols., 2007; Ormerod, 2008).

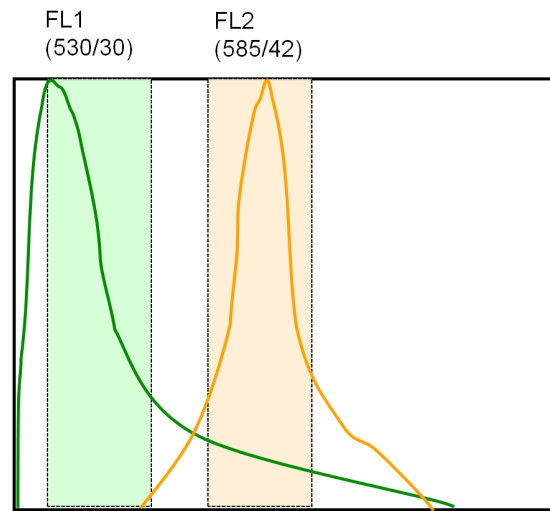


Figura 5. Esquema representativo de los espectros de emisión de FITC y PE. Los rectángulos con línea punteada representan los filtros que colectan la señal de cada fluorocromo. Modificado de Ormerod, 2008.

La compensación es muy importante para obtener datos confiables de las muestras analizadas, por lo que se han diseñado programas de computación que permiten realizar este proceso, en forma manual, o completamente automática y con la opción de una compensación de los datos posterior a la adquisición (Tung y cols., 2007).

Bibliografía

- Barrera Ramírez L.M., Drago Serrano M.E., Pérez Ramos J., Zamora A.C., Gómez Arroyo F., Sainz Espuñes T.R y Mendoza Pérez F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 17: 42-55.
- Dean P.N. y Hoffman.R.A. 2007. Overview of flow cytometry instrumentation. En: *Current Protocols in Cytometry*. Wiley-Liss Publication, New York, EUA. 1.1.1-1.1.8.
- Hoffman R.A. 2008. Flow cytometry: instrumentation, applications, future trends and limitations. *Springer Ser Fluoresc*, 6: 307-342.
- Macey M. 2010. Principles of flow cytometry. En: *Flow cytometry: principles and applications*. 3a ed., 2a reimpression. Macey M.G. (editora). New Jersey, EUA, editorial Human Press. 1-15 pp.
- McCarthy D.A. 2010. Fluorochromes and Fluorescence. En: *Flow cytometry: principles and applications*. 3a ed., 2a reimpression. Macey M.G. (editora). New Jersey, EUA, editorial Human Press. 59-112 pp.
- Ormerod M.G. 2008. *Flow Cytometry: A Basic Introduction*. De Novo, EUA. 116 pp. (<http://flowbook.denovosoftware.com/>)
- Ortiz R., Rodríguez L., Cortés L., Nájera O., Rodríguez E. y Cortés E. 2006. Estudios con citometría de flujo. Inmunofenotipo, proliferación, diferenciación, muerte celular y análisis de ADN. En: *Tópicos de Genética*. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 345-366 pp.
- Shapiro H.M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4 ed. Editorial Wiley-Liss, EUA.
- Shapiro H.M. y Telford W.G. 2009. Lasers for flow cytometer. En: *Current Protocols in Cytometry*. Wiley-Liss Publication, New York, EUA. 1.9.1-1.9.17 pp.
- Tung T.W., Heydari K., Tirouvanziam R., Sahaf B., Parks D.R., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. 2007. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin. Lab. Med.*, 27: 423-467.

Seguridad en el laboratorio

El laboratorio de citometría de flujo, como en cualquier laboratorio, se deben seguir medidas de seguridad, puesto que para el desarrollo de las diferentes metodologías para marcar a las células, se utilizan diferentes sustancias que implican ciertos riesgos de diferentes tipos. Un manejo inadecuado de estas sustancias, pueden provocar un accidente, como la exposición a ciertas moléculas que sean tóxicas, mutagénicas o cancerígenas (Lunn y Lawler, 2006). Otro tipo de riesgo son los debidos al manejo de muestras biológicas, principalmente cuando hay posibilidades de la presencia de agentes biológicos infecciosos (OMS, 2005; Santos-Burgoa y cols., 2003).

Para lograr protección durante el manejo de químicos y muestras biológicas, se debe utilizar equipo adecuado y la ropa de protección adecuada. En algunos casos, se requerirá de equipo adicional como una máscara para evitar inhalación de gases, etc.

En nuestro país se han publicado leyes y normativas para el manejo adecuado de sustancias químicas peligrosas así como sus residuos, y de residuos peligrosos biológicos infecciosos. Algunas de las normas y leyes son las siguientes:

Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos

1. NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
2. NOM-018-STPS-2000. Establece el sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
3. NOM-087-ECOL-1995. Contiene los criterios para la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).
4. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Establece las modificaciones de los criterios para la clasificación de los RPBI.

Estas normas y leyes pueden ser consultadas en el Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Salud, así como el Diario Oficial de la Federación.

Manejo de sustancias químicas

El manejo de sustancias químicas en el laboratorio de citometría de flujo implica riesgos y para minimizarlos, es importante seguir lineamientos de seguridad para evitar posibles accidentes, y en caso de que sucedan, minimizar los daños. En un reporte que apareció en la revista Scientific American (Benderly, 2010) se dio la reseña de un accidente que ponía en relevancia las consecuencias de un manejo inadecuado de sustancias químicas peligrosas debido a un exceso de confianza, o negligencia. Lo anterior muestra que debemos hacer conciencia de que nuestra seguridad depende del manejo responsable que hagamos de las instalaciones y los productos químicos. Por las anteriores razones, a continuación se enumeran los pasos que se deben seguir para evitar un posible riesgo:

1. Previamente a la realización de un experimento, revisar las reglas de seguridad y procedimiento que aplican en el trabajo en el laboratorio.
2. Revisar las hojas de seguridad del material químico que se va a usar.
3. Uso de ropa apropiada en el laboratorio: esta va a depender de las sustancias químicas que se usen. En el caso de este manual, se usará la bata de tela 100% algodón.
4. Uso de guantes adecuados. El artículo de Lunn y Lawler (2006) muestran una lista de algunos reactivos químicos y los guantes de material adecuado para su manejo. Para retirarse los guantes que ya fueron utilizados, se debe hacer de manera que no se toque la superficie exterior del guante, para evitar contacto con la piel. Se deben descartar de manera adecuada. Nunca reusar.

5. Zapatos adecuados. Deben cubrir los pies y ser cómodos. Las zapatillas, sandalias, zapatos de lona y caucho y los que son abiertos son de alto riesgo.
6. Protección adecuada para los ojos (Consultar Vega y Konigsberg, 2001).
7. Localizar y saber operar el equipo de emergencia. Ejemplos: extintores, regaderas de emergencia.
8. Nunca consumir alimentos o bebidas. Aunque parece obvio, muchos alumnos se han puesto en riesgo al hacer caso omiso de esta recomendación.
9. Nunca pipetear con la boca.
10. Nunca jugar o hacer bromas en el laboratorio.
11. Lavarse las manos después de la sesión de laboratorio.

Las hojas de datos de seguridad, conocidas como HDS o por sus siglas en inglés MSDS, las provee el fabricante de las sustancias químicas por disposiciones internacionales. Estas hojas contienen información importante de cada sustancia, como información del fabricante, la forma adecuada de manipulación, uso, riesgo conocido o potencial, lista de otras sustancias que estén presentes, primeros auxilios en caso de exposición accidental, qué hacer en caso de derrame, etc. Por estas razones, es muy importante leerlas con detenimiento y conservarlas (Shugar y Ballinger, 2011; NOM-018-STPS-2000).

Las sustancias químicas deben almacenarse de forma adecuada por seguridad. Además, algunas sustancias no pueden mezclarse con otras, puesto que hacen una reacción violenta. Por tanto, al ser incompatibles, deben guardarse separados. Es posible consultar una lista de incompatibilidad en la bibliografía. Ejemplos como reactivos químicos incompatibles están los alcoholes, que son inflamables y los ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico que se clasifican como corrosivos. El ácido acético se considera una excepción, pues es corrosivo y sus vapores son inflamables, por lo tanto debe guardarse con las sustancias inflamables (Lunn y Lawler, 2006; Shugar y Ballinger, 2011; NOM-052-SEMARNAT-2005).

A continuación se hace una relación de algunos reactivos químicos comunes en los protocolos de un laboratorio de citometría de flujo (Lunn y Lawler, 2006). Algunos de ellos son tóxicos, irritantes, mutágenos o cancerígenos, por lo que un manejo adecuado es indispensable, como cualquier otra sustancia química. Los efectos de algunos de ellos no se observarían de forma inmediata, por lo que no sería posible detectar la contaminación.

Substancia química	Uso	Riesgo
7-amino actimicina D (7-AAD)	Intercalante de ADN	Cancerígeno potencial
Azida de sodio	Conservador	Cancerígeno, tóxico
5-bromo desoxi-uridina (BrdU)	Análogo de la timidina.	Mutagénico, teratogénico, fotosensible
Bromuro de etidio (BrEt)	Intercalante de ADN	Muy tóxico, mutágeno
Cianinas (Cy5, Cy7)	fluorocromos	Tóxicos
4'6-diamidino-2-fenil indol (DAPI)	Intercalante de ADN	Mutagénico
Fluoresceína y sus derivados	Conjugación con proteínas. Fluorocromo verde.	Cancerígeno, tóxico
Ficoeritrina	Conjugación con proteínas. Fluorocromo amarillo.	Tóxico
Formaldehído	Fijador	Cancerígeno, líquido inflamable, teratogénico, tóxico
Glutaraldehído	Fijador	Corrosivo, teratogénico, tóxico
Hoechst 33258	Intercalante de ADN	Mutagénico, tóxico
Naranja de acridina	Intercalante de ácidos nucleicos	Cancerígeno, mutagénico
Paraformaldehido	Fijador	Inflamable, tóxico, irritante
Rodamina y derivados	Fluorocromo	Tóxico
Rojo Texas	Fluorocromo	Tóxico
Syto (colorantes)	Intercalantes de ácidos nucleicos	Tóxico
Yoduro de propidio	Intercalante de ácidos nucleicos	Mutagénico

Cuadro 2. Substancias químicas peligrosas de uso común. **Nota:** Para una lista más completa, se puede consultar Lunn y Lawler (2006) así como la NOM-052-S EMARNAT-2005.

Disposición de residuos peligrosos químicos

Se consideran como residuos peligrosos químicos a aquellas sustancias que han perdido sus características, sus propiedades han dejado de ser útiles, se encuentran fuera de especificaciones, o ya se encuentran caducos. También se consideran peligrosos si tienen alguna o más de las siguientes características: corrosivos, explosivos, tóxicos e inflamables (INPer, 2011).

La disposición de los residuos peligrosos químicos se hará dependiendo de la clase de sustancia que se trate.

Residuos de soluciones ácidas o básicas

Este tipo de desechos se depositarán en la tarja mientras la llave de agua se mantiene abierta, esto con el propósito de diluir la solución. Después de haber eliminado la solución, se mantiene la llave abierta para enjuagar la tarja y evitar la capacidad corrosiva de la solución eliminada (Vega y Konigsberg, 2001; Shugar y Ballinger, 2011).


Residuos de sustancias tóxicas

La Universidad Autónoma Metropolitana tiene un programa para la disposición y eliminación adecuada de los residuos peligrosos químicos, llamado "Laboratorio Seguro". Para poder hacer uso de este servicio es necesario realizar los siguientes pasos (Vega y Konigsberg, 2001; Shugar y Ballinger, 2011):

1. Consultar las hojas de seguridad de las sustancias químicas que se han convertido en residuos antes de disponer de ellos.
2. Separar los residuos para evitar cualquier reacción química.
3. Colectar en un recipiente adecuado y etiquetar con la información del residuo químico.
4. Minimizar el desperdicio.

Es importante utilizar envases adecuados que permitan un cierre hermético, que sean de un material adecuado al tipo de residuo, para evitar fugas y derrames que pongan en riesgo al personal (INPer, 2011). Se debe consultar también la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos y la NOM-052-SEMARNAT-2005.

Una vez que se han realizado los pasos anteriores, se accede a la página electrónica del programa "Laboratorio Seguro" (<http://www.izt.uam.mx/residuos/>) y llenar el formulario. Si se observa en la imagen del formulario, se muestra la clasificación y el código en imagen de la sustancia peligrosa. Una vez realizado, se solicita la llave del almacén temporal de los residuos y se lleva el residuo peligroso químico al lugar para su posterior disposición.


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
 UNIDAD IZTAPALAPA

PROGRAMA DE LABORATORIO SEGURO

Proporcione la siguiente información para registrar el residuo.

IMPORTANTE: Después de enviar la información acuda a la Secretaría de la Unidad para obtener las etiquetas correspondientes.

Datos obligatorios

Economico :

Nombre :

Ubicacion :

Division : CBI

Depto :

Extension :

Residuo :

Medida : KILOGRAMO

Cantidad :

CÓDIGO CRETIB







					
Corrosivo	Reactivo	Explosivo	Tóxico	Inflamable	Infeccioso
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figura 6. Imagen del formato disponible en la página electrónica del programa “Laboratorio Seguro”. Se observan los símbolos del código CRETIB que identifican a cada tipo de residuo peligroso.

Manejo de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos.

Como se había mencionado antes, el manejo de material biológico también implica riesgos. La Organización Mundial de la Salud y la Secretaría de Salud en nuestro país, señalan que las muestras biológicas generan residuos peligrosos biológico-infeccioso (RPBI), razones por las cuales dan guías que ayudan a un manejo adecuado (Santos-Burgoa y cols. 2003; OMS, 2005).

La NOM-087-ECOL-SSA1-2002 señala que solo se considera RPBI a los residuos que contienen agentes biológico-infecciosos. Sin embargo, la OMS (2005) menciona que en caso de que la información sea limitada para evaluar el riesgo, el residuo debe manejarse como Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) y hace una serie de recomendaciones que se enlistan a continuación:

Protección personal

1. Usar ropa protectora: batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Usar guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con material biológico (sangre, líquidos corporales y otros) potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, retirar los guantes de forma aséptica y a continuación lavarse las manos.
3. Lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Usar gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
5. Prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio.
6. No usar calzado sin puntera.
7. Prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
8. Prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
9. La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle.

El material punzocortante, por ejemplo las agujas, se considera como el principal riesgo en la transmisión de enfermedades infecciosas, así que se debe tener cuidado en el manejo de estos materiales. Las agujas de jeringas desechables, lancetas, navajas de bisturís que se utilizan en la obtención o manejo de material biológico deben separarse y desecharse en recipientes rígidos de polipropileno de color rojo y con el símbolo de RPBI (Figura 2). El material de vidrio roto no se considera material punzocortante y se colecta en otro tipo de recipiente (Santos-Burgoa y cols. 2003).

Bibliografía

- Benderly B.L. 2010. Danger in school labs. *Scientific American*, 303: 18-20.
- Instituto Nacional de Perinatología. 2011. Manual para el manejo de los residuos peligrosos de tipo químico. Disponible en: <http://www.inper.edu.mx/descargas/pdf/CRETI.pdf> (Consultada el 15 de julio de 2012).
- Lunn G. y Lawler G. 2006. Safe use of hazardous chemicals. En *Currents Protocols of Cytometry*. Wiley-Liss Publication, New York, EUA. 3.4.1-3.4.38.
- Organización Mundial de la Salud. 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3a. ed. Génova, Organización Mundial de la Salud.
- Santos-Burgoa C., Rivero Rodríguez L., González Mesa R., Cebrain Gómez A. 2003. Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud. Secretaría de Salud. México. 31 pp.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2006. Norma Oficial Mexicana NOM-052-2005. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2003. NOM-054-SEMARNAT-1993-SEMARNAT-1993. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría del Trabajo y Previsión Social. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2000. Diario Oficial de la Federación.
- Shugar G.J. y Ballinger J.T. 2011. *Chemical technicians ready reference handbook*. 5a. ed. McGraw-Hill, Nueva York, E.U.A. 704 pp.
- Vega Ávila E. y Konigsberg Fainstein M. 2001. La teoría y la práctica en el laboratorio de química general para Ciencias Biológicas y de la Salud. México, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 219 pp.

Términos en citometría de flujo

La citometría de flujo contiene términos que en su origen está el idioma inglés. Sin embargo, en este manual de prácticas se han traducido estos términos con las palabras del vocabulario en español con el significado más cercano, acompañado con la palabra en inglés entre comillas o paréntesis. Esta estrategia se hizo para que el alumno reconozca los términos en la literatura escrita en su mayoría en inglés. Las secciones de Abreviaturas y Vocabulario son complementarias como ayuda en el manejo de la terminología.

Los nombres de los programas de computación se han escrito en cursivas. Los términos que son usados como funciones o comandos de los programas se escribieron en inglés en letras cursivas, para facilitar su reconocimiento.

Práctica 1

Demostración del citómetro de flujo

Introducción

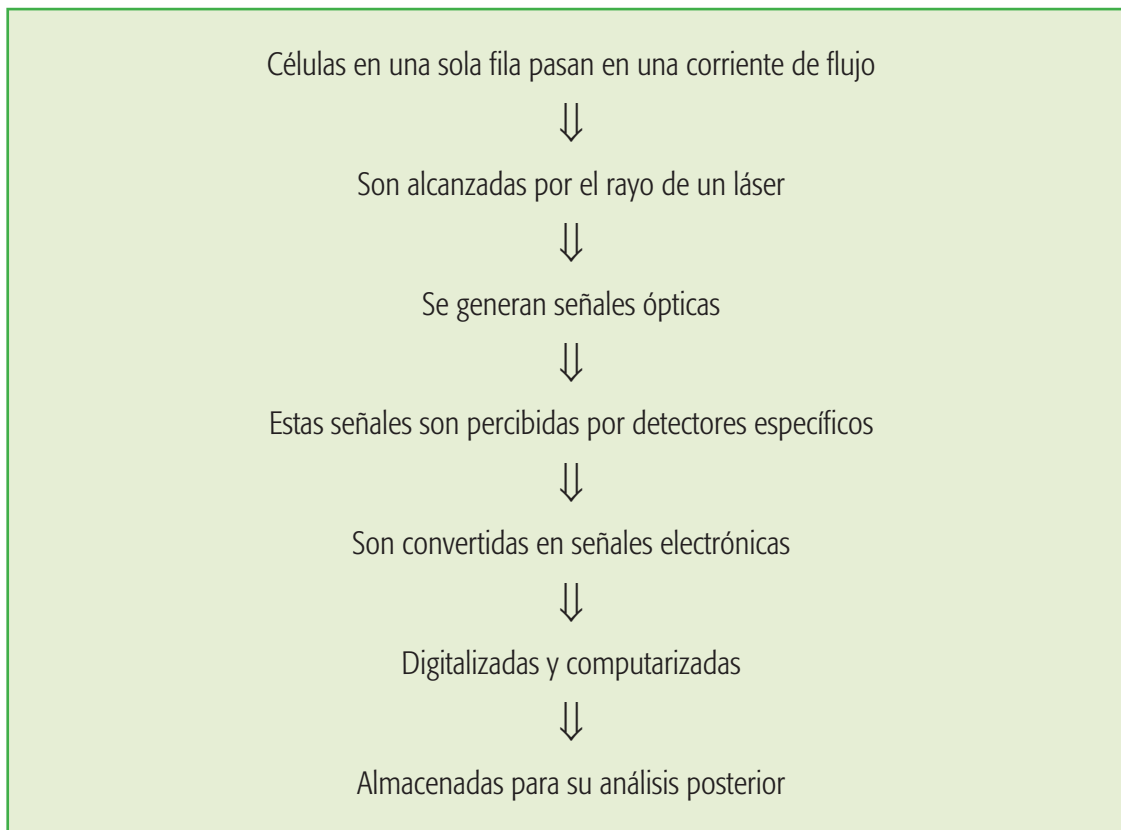
Para el estudio de las células se han desarrollado diversas metodologías analíticas. La citometría de flujo (CF) ha surgido como una metodología fundamental y eficaz para la detección específica de una gran variedad de características y componentes estructurales de las células.

Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir simultáneamente múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad, así como cualquier componente celular o función, marcada con un colorante fluorescente o fluorocromo. Aunque la CF es una tecnología relativamente reciente, se han vislumbrado muy diversas aplicaciones tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos

Un citómetro de flujo es capaz de examinar miles de células en unos cuantos segundos con una alta eficiencia y sensibilidad, efectuando de forma paralela la detección de varias propiedades de una misma célula, las cuales son analizadas una a una.

Las células ingresan al citómetro de flujo en una sola fila a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, en una corriente de flujo, que es alcanzada por el rayo de un láser. Así, se generan señales ópticas, que al ser percibidas por detectores específicos, se convierten en señales electrónicas. Estas son digitalizadas y computarizadas en milisegundos, se almacenan y pueden ser analizadas posteriormente

Los procesos que se llevan a cabo en la adquisición con el citómetro de flujo, se sintetizan en el **Cuadro 1**.



Cuadro 1.- Resumen de los procesos que se realizan en la adquisición con el citómetro de flujo.

Componentes del citómetro de flujo

Para que el citómetro pueda medir diferentes características de las células, está compuesto por tres grandes sistemas, cada uno de estos sistemas tiene una función específica. Además cada sistema tiene diversos componentes. En el **Cuadro 2** se anotan estos tres sistemas y su función general.

Sistema	Función	Componentes generales
Fluidos	Introducir y alinear a las células para ser medidas.	Tubo de inyección de la muestra. Cámara de flujo
Ópticos	Generar y coleccionar las señales luminosas.	Óptica de excitación: (Láser, pueden ser varios) Óptica de adquisición: (Lentes, Espejos y filtros y Detectores)
Electrónicos	Convertir las señales ópticas a señales electrónicas proporcionales y digitalizarlas para análisis en computadora.	Sensores sensibles / luz fotodiodos y fotomultiplicadores

Análisis de los datos adquiridos

Los citómetros de flujo están integrados por el equipo en sí mismo, el cual está conformado por diversos elementos, integrados en el “módulo sensor”. Además, el aparato se encuentra asociado a una computadora que tiene diferentes programas para almacenar la información en forma de archivos; la computadora registra datos de millares de células de cada muestra y, estos pueden ser representados gráficamente para su análisis posterior.

Los datos adquiridos se pueden representar gráficamente, de ahí se obtiene información con relación a los diferentes parámetros. Para el análisis de los datos se puede elegir el examen del total de los mismos o es factible también analizar solamente una parte de ellos, al determinar previamente una región específica de análisis. La región puede definirse por la dispersión de la luz o con base en una fluorescencia así, solo los eventos (células) que están dentro de los límites de la región elegida son desplegados, pudiéndose hacer el estudio en una población específica.

En la **Figura 1**, se muestra un histograma en donde se analiza solamente un parámetro. En la **Figura 2**, se presenta una gráfica de punto (dot plot) del análisis simultáneo de dos parámetros, en la gráfica cada punto corresponde a un evento (una célula). En la **Figura 3** se representa una gráfica de densidad, en donde se observa la distribución de los eventos de acuerdo a las características seleccionadas.

Es oportuno anotar que para la realización de los diferentes estudios, en todos los casos, es muy importante ajustar y verificar el funcionamiento del citómetro de flujo, preparar adecuadamente las células así como, adquirir y analizar las muestras con un programa de computación apropiado.

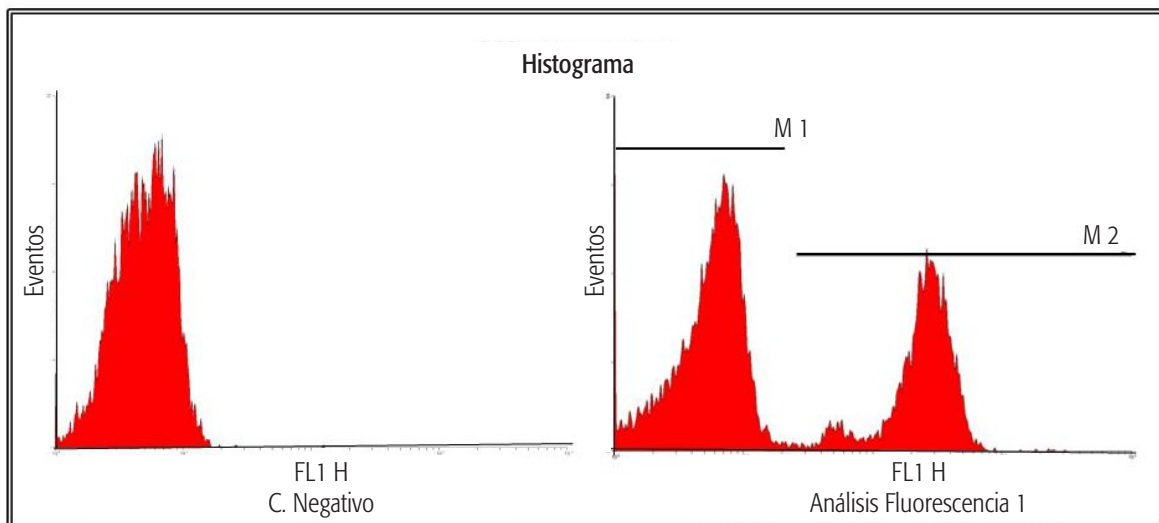


Figura 1.- Histograma del análisis de datos obtenidos con el citómetro de flujo. En el eje horizontal (X), se grafica la intensidad de fluorescencia y en el eje vertical (Y) el número de células. En la parte izquierda se observa el control negativo y en la parte derecha una muestra positiva a la fluorescencia 1.

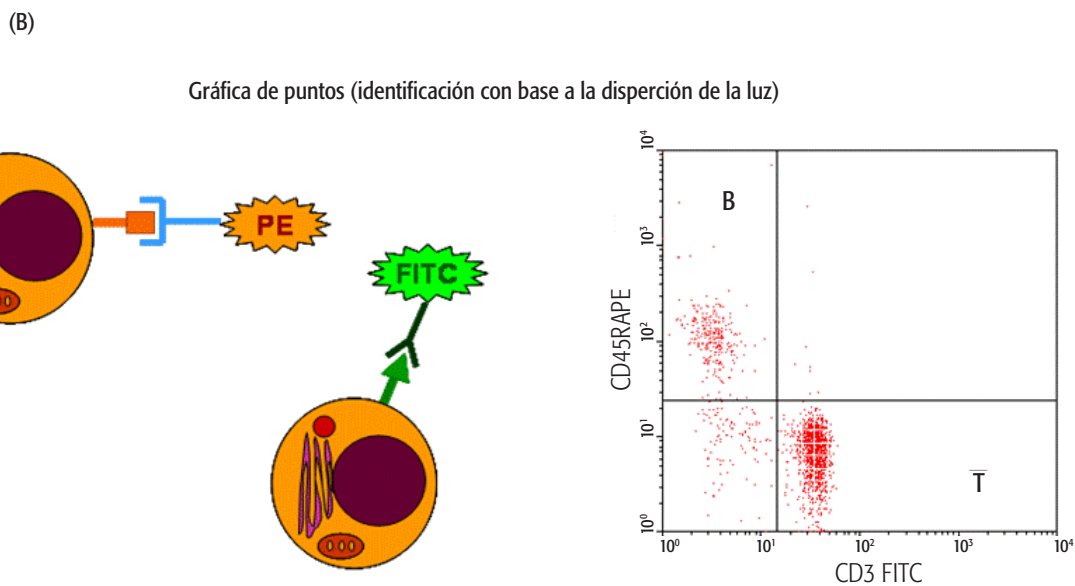
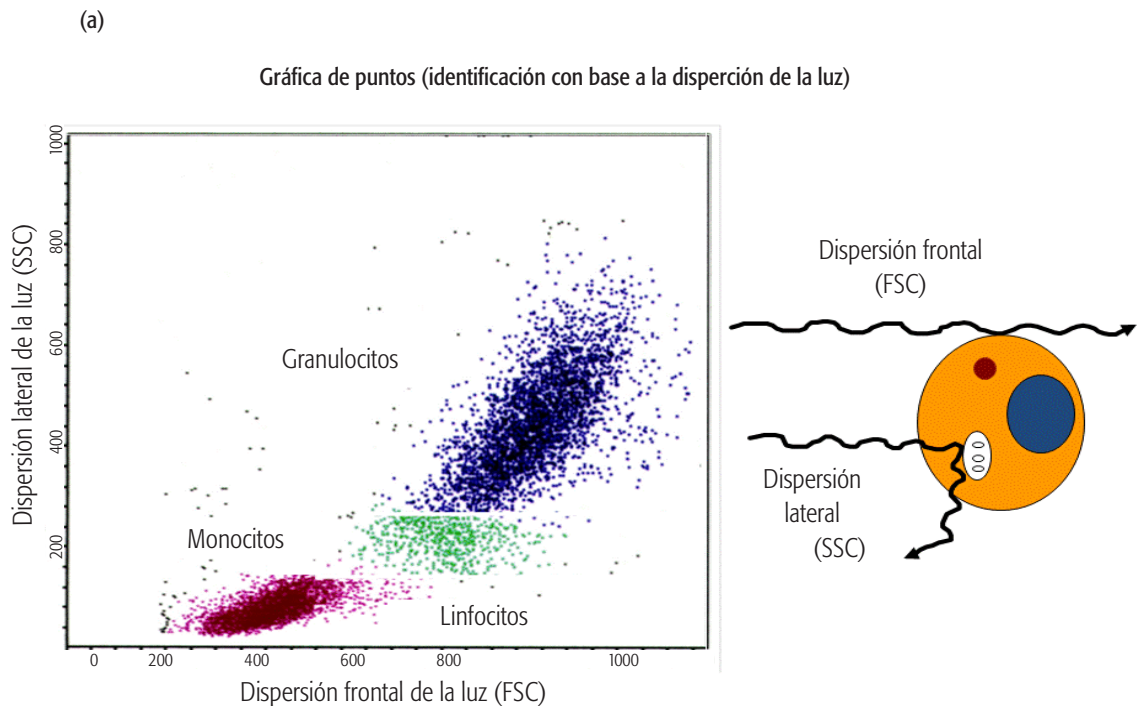


Figura 2.- Gráficas de puntos (dot plot). (a) Identificación de leucocitos de sangre periférica de humano, con base en la dispersión de la luz, se diferencian en forma clara los linfocitos, monocitos y granulocitos. La luz con dispersión frontal (FSC) se relaciona con el tamaño celular y la luz con dispersión lateral (SSC) se relaciona con la granularidad y complejidad interna de la célula. Se detecta a 90° del eje de la luz incidente. (b) Identificación de linfocitos T y B de sangre periférica de rata, con base en la tinción con dos diferentes fluorocromos. Los linfocitos T (CD3+) son positivos al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se observan en el cuadrante inferior derecho. Los linfocitos B (CD45RA+) son positivos al fluorocromo ficoeritrina (PE) y se localizan en el cuadrante superior izquierdo. Las células negativas a ambos fluorocromos (no son linfocitos T, ni linfocitos B) se detectan en el cuadrante inferior izquierdo y, los linfocitos positivos para ambos fluorocromos se encuentran en el cuadrante superior derecho.

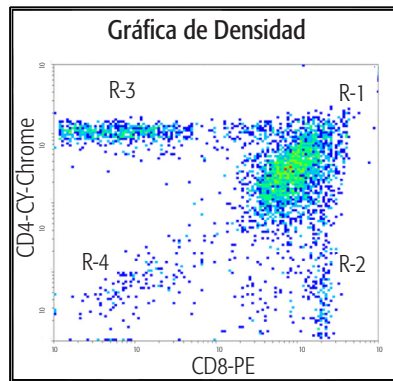


Figura 3.- Gráfica de densidad. Caracterización de las subpoblaciones celulares en el timo de ratón.

R1= Células CD4+ CD8+, son positivas para ambos fluorocromos: ficoeritrina (PE) y cianina de ficoeritrina (Cy), son la subpoblación más abundante, están en fase de diferenciación o maduración; R2 = Células CD8+, solo son positivas a PE, corresponden a los timocitos maduros D8+; R3 = Células CD4+ solo son positivas a Cy, son a los timocitos maduros CD4+ y, R4= Células CD4-CD8- son negativas para ambos fluorocromos, constituyen los timocitos más inmaduros.

Citómetros de flujo

En la actualidad existen diversos tipos de citómetros de flujo. En nuestra Institución, dentro de División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, contamos con dos citómetros de flujo: 1) citómetro modelo FACScan (Figura 4), y 2) citómetro modelo FACScalibur (Figura 5), ambos de la compañía Becton Dickinson.



Figura 4.- Citómetro de flujo modelo FACScan, equipado con un láser de argón (488nm); con capacidad de detectar dos formas de dispersión de la luz y tres diferentes fluorescencias.



Figura 5.- Citómetro de flujo modelo FACScalibur, equipado con un láser de argón (488nm) y láser de diodo rojo; con habilidad de detectar dos formas de dispersión de la luz, cuatro diferentes fluorescencias y capacidad de separar selectivamente y coleccionar células ("sorting").

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Además, en comparación con los métodos bioquímicos de análisis celular, en los que se obtiene un resultado promedio para toda la muestra, la CF es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes, incluso cuando están escasamente representadas.

Objetivo

Conocer los componentes principales y el funcionamiento general del citómetro de flujo.

Material requerido

Citómetro de flujo

3 tubos de poliestireno de 5 ml (12 x 75 mm)

3 ml de agua destilada

3 ml de solución de cloro al 10%

3 ml de etanol al 50%

Archivos adquiridos en el citómetro de flujo, proporcionados por el profesor

Método o desarrollo

1. Encendido del equipo.
2. Identificación de las partes del citómetro.
3. Elegir la velocidad de flujo de la muestra.

4. Observación de datos obtenidos con el citómetro de flujo. Se usará el programa de adquisición y análisis CellQuest y se observarán archivos adquiridos en el citómetro de flujo, proporcionados por el profesor.
5. Se solicitarán gráficas de diferentes tipos. Anote la información de los archivos y la información que obtenga con cada uno de los archivos examinados.
 - 5.1 Análisis de un histograma,
 - 5.3 Observación de gráficas de puntos (dot plot).
 - 5.3 Examen de una gráfica de densidad.
6. Cuidado del equipo (Procedimiento de lavado del equipo, al final del trabajo).

Procedimiento de lavado diario del citómetro

Automático. Este proceso se realiza si cuenta con el sistema de carrusel (loader, en inglés)

1. Una vez terminado el trabajo diario, cerrar el programa en uso.
2. Ir a la barra de Menú y elegir el ícono de Apple.
3. Señalar *Loader Manager*.
4. Se abrirá una ventana: *Loader Status*. Marcar *Maintenance*.
5. Se abrirá la ventana *Maintenance and Diagnostics*.
6. Elegir *Short Clean* y presionar *RUN*.
 - a. En un tubo de 12 x 75 mm, agregue 3 ml de etanol al 50%.
 - b. Instale el tubo en la posición 39 del carrusel.
 - c. En la posición 40 instale un tubo con 3 ml de blanqueador al 10% en agua.
 - d. El programa *Loader Manager* colocará automáticamente cada tubo para lavar el puerto de inyección para su limpieza.
7. Al terminar el proceso de lavado, cambie el tubo con blanqueador a la posición 39 y coloque otro con 3 ml de agua en la posición 40.
8. Regrese a la ventana *Maintenance and Diagnostics*. Elija *long clean* y presione *RUN* (el programa *Loader Manager* colocará automáticamente cada tubo para lavar el puerto de inyección para su limpieza).
9. Una vez terminado el lavado, salir de la ventana de *Maintenance and Diagnostics*, seleccionando el botón *Done*.
10. Coloque un tubo con 1 ml de agua destilada en el SIP con el brazo bajo el tubo.
11. Ponga el citómetro en modo de *Standby* y apáguelo.
12. Deseche los residuos al chorro de agua.
13. Apague la computadora y el regulador.

Manual. En caso de que no cuente con el carrusel y se pongan los tubos manualmente siga los siguientes pasos:

1. Instale un tubo de 12 x 75 mm, conteniendo 3 ml con alcohol al 50% en el puerto de inyección de la muestra (SIP).
2. Deje al brazo de apoyo a un lado por un minuto.
3. Coloque el brazo bajo el tubo, y asegúrese de que el citómetro esté en *RUN*, y déjelo en velocidad alta (*HIGH*) por cinco minutos. Inicialmente, se lavará durante un minuto el tubo externo del SIP, y posteriormente se lavará el tubo interno, que es el sitio por el que pasa la muestra.
4. Repita los pasos del 1 al 3 con un tubo con 3 ml de blanqueador al 10%.

5. Repita los pasos 1 al 3 con otro tubo con 3 ml de agua bidestilada.
6. Deje un tubo con 1 ml de agua bidestilada en el SIP con el brazo bajo el tubo.
7. Ponga el citómetro en modo Standby.
8. Apague la computadora y apague el citómetro.

Resultados

Anote sus observaciones de cada uno de los incisos mencionados en el método.

Análisis de resultados

Comente la importancia de conocer el citómetro de flujo y mencione la trascendencia de los sencillos pasos de encendido, selección de la velocidad de flujo y lavado del equipo

Explique el alcance de analizar los datos por medio de un histograma, una gráfica de punto (dot plot) y una de densidad.

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base a sus observaciones.

Cuestionario

- 1.- ¿Qué información de las células se puede obtener usando citometría de flujo?
- 2.- ¿Cuáles son los tres tipos de sistemas que tiene un citómetro de flujo?
- 3.- ¿Qué fuente de luz es la más usada en los citómetros de flujo?
- 4.- ¿Por qué es importante conocer la fuente excitadora de luz que tiene un citómetro?
- 5.- Indique las dos principales características en las que se basa un citómetro de flujo para evaluar los parámetros (características de las células)
- 6.- Señale los dos tipos de dispersión de luz que detecta el citómetro y con cuáles características celulares se relacionan
- 7.- Mencione algunas ventajas del análisis por medio de citometría de flujo

CONTESTAR FALSO O VERDADERO:

- Las células deben estar en suspensión para ser analizadas por el citómetro de flujo. _____ .
- La muestra pasa a través del haz de luz excitador por grupos _____ .
- Los citómetros de flujo analizan las características individuales de cada célula, analizando cada una de ellas _____ .
- Diferentes mediciones se pueden hacer simultáneamente en una sola célula, esto es, en cada una de las células _____ .
- La citometría de flujo permite identificar, en una muestra heterogénea grupos o subtipos de células _____ .

Bibliografía

- Barrera-Ramírez LM, Drago-Serrano ME, Pérez-Ramos J, Zamora AC, Gómez-Arroyo F, Sainz Espuñes TR y Mendoza-Pérez F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 17: 42-55.
- Laguado J. 2007. Aplicaciones de la citometría de flujo en Microbiología, Veterinaria y Agricultura. *Rev. MVZ Córdoba* 12: 1077-1095.
- Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. 2010. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry A*. 77: 705-713.
- Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E y Betancourt M. 1999. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica* 24: 18-22.
- Ortiz R, Rodríguez L, Cortés L, Nájera O, Rodríguez E. y Cortés E. 2006. Estudios con citometría de flujo. Inmunofenotipo, proliferación, diferenciación, muerte celular y análisis de ADN. En: *Tópicos de Genética*. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 345-366 pp.
- Purdue University Cytometry Laboratories. <http://www.cyto.purdue.edu/> (Consultada el 30 de agosto de 2012).
- Ruiz-Argüelles A. 2002. La citología analítica moderna en el laboratorio de hematología. *Gac Méd Méx* 138: 155-158.

Práctica 2

Calibración del equipo y optimización

Introducción

El citómetro de flujo, como cualquier otro equipo, necesita un procedimiento de control de calidad para comprobar diariamente su buen funcionamiento. Dado que actualmente surgen nuevos modelos, se actualizan los existentes y cambian los sistemas de computación, no es posible dar un solo procedimiento para todo tipo de modelos. Sin embargo, en todos los casos, el uso de microesferas de plástico estándar, fluorescentes y no fluorescentes permite hacer el seguimiento diario del citómetro de flujo. Es importante señalar que del buen funcionamiento del equipo depende la confiabilidad de los resultados de un ensayo en investigación o las pruebas clínicas de laboratorio de un paciente.

El programa *FACSCComp* es capaz de comprobar el desempeño de algunos modelos de citómetros de la marca BD Biosciences, como el *FACScan* y el *FACScalibur*. *FACSCComp* provee un ajuste automatizado, y comprueba que el equipo analiza cada uno de los eventos de manera consistente.

Para lo anterior, se utilizan unas microesferas de polimetilmetacrilato, también llamadas perlas, de 5 a 6 μm de diámetro para la calibración (*CaliBRITE Beads*, ^{MR}). Estas microesferas pueden ser de cuatro o cinco tipos: sin teñir, teñidas con isotiocianato de fluoresceína (FITC, verde), ficoeritrina (PE, naranja), proteína de clorofila peridina (PerCP, rojo) ó aloficoncianina (APC, rojo).

El *FACSCComp* y las microesferas están diseñadas para hacer el seguimiento de la función del citómetro, y también para que quede calibrado para aplicaciones de identificación inmunofenotípica de células sanguíneas humanas. Parece limitado, pero hay que mencionar que el desarrollo de los equipos de esta marca se han dado en el marco de la investigación en inmunología humana para aplicación en clínica. El programa permite dos clases de calibración, basadas en las posibilidades de ensayos con muestras sanguíneas humanas:

- *Lisadas y lavadas (Lyse/Wash, en inglés)*: es la calibración del citómetro para muestras en los que se lisan los eritrocitos y se eliminan del resto de las células por centrifugación.
- *Lisadas y no lavadas (Lyse/No Wash, en inglés)* calibración diseñada para ensayos en los que se lisan los eritrocitos pero no se eliminan sus restos.

Durante la calibración se realizan los siguientes procedimientos en secuencia:

1. Ajuste de los tubos fotomultiplicadores (PMT, por sus siglas en inglés de *photomultiplier tube*): Ajusta los valores del citómetro para colocar a las partículas de calibración en los canales blanco estándar. Estos valores también se aplican en la compensación. Se realiza con las microesferas sin teñir.
2. Compensación de fluorescencias: Al efectuar la compensación se separa la contribución de cada fluorocromo, y de esta forma se elimina la sobre posición de las señales. Se requieren las perlas sin teñir y todas las teñidas.
3. Prueba de sensibilidad: Evalúa la separación de la fluorescencia entre los promedios de las perlas sin teñir y las teñidas en los canales FL1, FL2 y FL3. La sensibilidad de FL4 se miden al calcular la diferencia de separación entre las microesferas PerCP y APC en el canal FL4. También se compara la señal de SSC con un pulso generado en FSC.

En el caso de que se requiera el uso del cuarto color, se utilizan otras microesferas, teñidas con aloficoncianina (APC) y excitables con el segundo láser. En este caso, las perlas con APC servirán, además del ajuste de los PMTs, para calibrar el tiempo de retraso de las señales de los dos láseres que provengan de un mismo evento (o célula).

Debido a que las microesferas de calibración y las células tienen propiedades ópticas diferentes, deben visualizarse previamente las características de desviación de luz y fluorescencia de las muestras biológicas y ajustar el equipo para una adecuada lectura. A este procedimiento se le conoce como optimización y se puede realizar con el *FACSCComp*, solo para leucocitos de humano, o si son otro tipo de células, en el programa *CellQuest*.

La optimización se refiere, principalmente, a la compensación de las fluorescencias presentes en una muestra biológica. En forma sencilla podemos describir cuales son los pasos que se realizan en la compensación adecuada. Se ajustan los voltajes de cada PMT con una muestra sin marca de fluorescencia para observar a las células en los canales correspondientes a las células negativas. Después, se utilizan muestras marcadas con un solo fluorocromo (una muestra por fluorocromo que se vaya a utilizar) para ajustar la señal de cada fluorocromo para ser detectado por el PMT correspondiente, como se muestra en la Figura 1.

Objetivo

Al término de la práctica, el alumno será capaz de comprobar el funcionamiento del citómetro de flujo.

Objetivos Particulares

Ajustar el citómetro utilizando microesferas de calibración.

Optimización del citómetro para adquirir una muestra.

Material requerido

1 pipeta graduada de 5 ml

1 propipeta

1 vaso de precipitado de 50 ml

1 vaso de precipitado de 100 ml

2 tubos de poliestireno de 5 ml

1 gradilla

1 Agitador (vórtex)

Microesferas *CalIBRITE^{MR}* 3 colores

Solución envolvente comercial (*FACSflow*) ó una solución amortiguadora de fosfatos (3 litros aproximadamente)

Hielo

Papel aluminio

Citómetro *FACSCan* o *FACSCalibur*

Material biológico

Muestra de sangre obtenida por donación de un voluntario y obtenida con jeringa heparinizada. Esta muestra será preparada previamente por el profesor.

Soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4 (PBS): Pesar 0.23 g de NaH_2PO_4 (anhídrido), 1.15 g de Na_2HPO_4 (anhídrido), 9.00 g de NaCl. Disolver en 900 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.4. Aforar a 1 litro.

Nota de seguridad. Revisar las hojas de seguridad previamente. Se requiere el uso en todo momento de: bata de algodón, guantes de látex. Las agujas de las jeringas usadas con muestra de sangre, se descartan en el recipiente para punzocortantes.

Método o desarrollo

Preparación de microesferas

Tubo A.

En un tubo se agrega una gota de microesferas sin marcar (unlabeled) a 1 ml de solución envolvente comercial o una solución de fosfatos. Se agita en un vórtex. Mantener en frío y cubierto de la luz.

Tubo B.

En un tubo se prepara una mezcla de microesferas. Se añade una gota de microesferas sin marcar, otra de las marcadas con FITC, otra de PE y otra de PerCP a 3 ml de solución envolvente comercial (o solución de fosfatos). Se agita en un vórtex. Mantener en frío y cubierto de la luz.

Recomendaciones

- Las microesferas se diluyen usando la solución *Facsflow*. Sin embargo se puede usar el amortiguador de fosfatos a pH 7.4.
- Los viales que contienen las microesferas se deben agitar suavemente, ya sea por inversión o en un agitador.
- La gota debe tener un aspecto turbio, para asegurarse de que contenga microesferas.
- Las suspensiones se deben mantener en hielo o entre 2° a 8° C.
- Las microesferas diluidas permanecen estables durante 8 horas si se conservan en obscuridad entre 2° a 8° C. Si se usan microesferas con PerCP, la estabilidad es de una hora.

Ajuste y Compensación

Varios términos están escritos en inglés, puesto que son opciones del programa para calibración.

1. Introducirse al programa *FACSComp*, seleccionándolo desde el menú de Apple.
2. Llenar el campo de operador y presionar *Accept*.
3. Seleccionar el tipo de ensayo *Lyse/Wash* ó *Lyse/No Wash*.
4. Teclear los lotes de cada uno de los viales (es necesario para tomar en cuenta los valores de los canales de referencia).
5. Introducir el tubo A en el inyector de la muestra (SIP, por sus siglas en inglés de *sample injection port*).
6. Presionar *Run* hasta que aparezca la ventana de PMT para ajustar los fotomultiplicadores (PMT) y presionar *Start*.
7. Después del ajuste de los PMT, observar que se cambie a la ventana *Compensation*.
8. Cambiar el tubo A por el B y oprimir *Start*.
9. Observar que se logre la compensación y que el software pase inmediatamente a *Sensitivity*.
10. Observar los resultados y salir.

Optimización

Este procedimiento se realizará con la muestra proporcionada por el profesor según el siguiente cuadro:

Tubo	Fluorescencia de la marca en la muestra	Poblaciones celulares presentes
1	Sin marca fluorescente	Sin fluorescencia
2	Fluorescencia 1. FITC.	Negativas y positivas a FITC.
3	Fluorescencia 2. PE	Negativas y positivas a PE.
4	Fluorescencia 3. PerCP	Negativas y positivas a PerCP.
5	Fluorescencias 1, 2 y 3. Marcaje simultáneo con FITC, PE y PerCP	Negativas y poblaciones celulares positivas a un fluorocromo.

Cuadro 1. Guía de preparación de la muestra proporcionada por el profesor

El cuadro anterior es una guía y puede variar según la disponibilidad de muestra y anticuerpos. Si no hay disponibilidad, se pueden usar las mismas microesferas de calibración, en un esquema similar al cuadro 1.

1. Introducirse a *CellQuest* a través del menú Apple. Varios términos están escritos en inglés, puesto que son opciones del programa.
2. En el menú de herramientas abrir *Acquire* y conectar el citómetro.
3. Crear la hoja de adquisición con las siguientes gráficas de punto en modo de adquisición:
FSC vs SSC
FL1 vs FL2
FL3 vs FL2
4. Abrir los controladores *Detectors*, *Compensation* y *Threshold* desde el menú *Cytometer*.
5. A partir del menú *Cytometer*, abrir *Instruments Settings* y elegir el archivo *Calib file*.
6. Seleccionar set y después done. Cerrar la ventana.
7. Además colocar los cuadrantes en los gráficos FL1 vs FL2 y FL3 vs FL2, a través de la paleta de herramientas, en aproximadamente en la posición 10^1 en ambos ejes.
8. Seleccionar *Parameter Description* del menú *Acquire* para crear el folder para guardar los datos y poner nombre a los archivos.
9. Colocar el tubo 1. Adquirir la muestra antes de ajustar para un análisis posterior.
10. Repetir el paso 9 con los demás tubos.
11. Colocar el tubo 1 para ajustar el voltaje de los detectores para FSC y SSC, hasta que la población de las células en la gráfica de tamaño y granulosidad esté colocada en la posición deseada.
12. Con este mismo tubo, ajustar el voltaje de los PMT para FL1, FL2 y FL3, hasta ajustar las gráficas con los eventos en el cuadrante inferior izquierdo. Retirar el tubo al terminar.
13. Colocar el tubo 2.
14. Ajustar la compensación, usando el controlador *Compensation*, tratando de poner los eventos positivos en el cuadrante correspondiente.

15. Repetir los pasos 12 y 13 para el tubo 3.
16. Coloque el tubo con la muestra marcada con todos los fluorocromos.
17. Adquirir 10,000 eventos de cada muestra.

Utilice la **Figura 1** como guía. Cada representación gráfica muestra cómo se observa cada población celular después de la optimización.

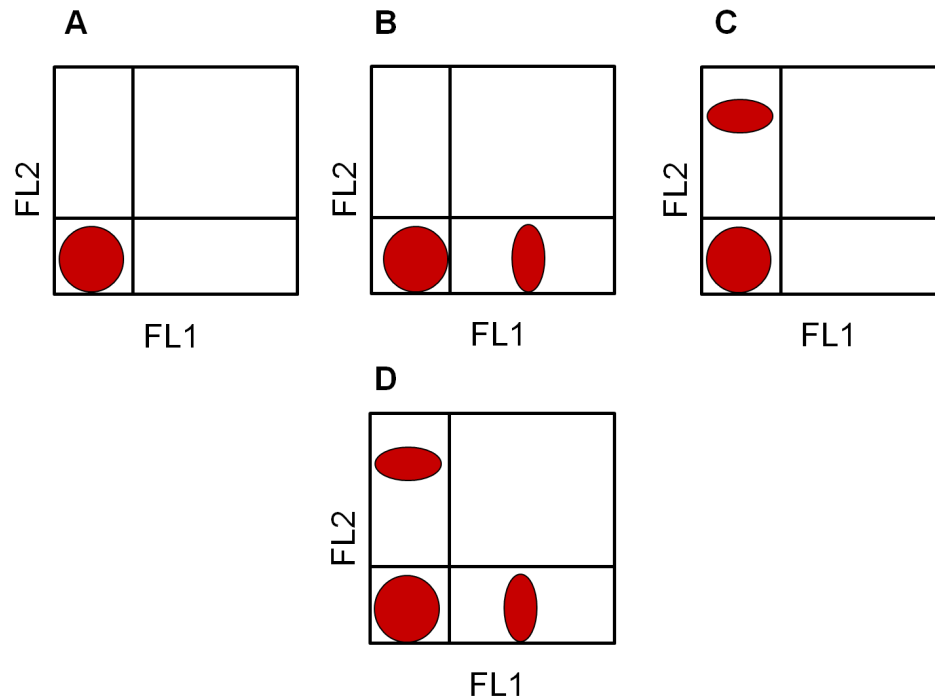


Figura 1. Representación de las gráficas obtenidas durante la compensación. A) Las células de la muestra sin marcar se observan en el cuadrante inferior izquierdo. B) Se observan dos poblaciones celulares, sin marcar en el cuadrante inferior izquierdo y la marcada con FITC el inferior derecho. C) Se observa en el tubo 2 la población negativa a PE y la positiva en el cuadrante superior izquierdo. D) Se representa una muestra con negativas a la fluorescencia y células marcadas con ambos fluorocromos.

Resultados

Visualice en gráficas de punto las muestras antes y después de la optimización. En el caso de la muestra sin marcar, muestre en las gráficas los parámetros FSC y SSC, con el que se representa el tamaño y granularidad respectivamente. Utilice el programa CellQuest para obtener las gráficas y datos.

En las muestras marcadas grafique FL1 vs FL2 y FL3 vs FL2, en donde se observa la fluorescencia. En estas últimas gráficas, se deben observar los eventos en el cuadrante inferior izquierdo, después de la optimización. También muestre en gráficas FL1 vs FL2 y FL3 vs FL3, las muestras que están marcadas con cada uno de los reactivos, antes y después de la optimización para mostrar la compensación del equipo.

- Imprimir los informes de los resultados de la calibración y guardarlos en un registro.
- Anotar los voltajes de los tubos fotomultiplicadores y las separaciones de los canales que se obtienen con cada parámetro en una hoja de un registro.

Análisis de Resultados

Mencione la importancia de realizar la calibración del equipo y la optimización para la lectura de las muestras. Con base en sus resultados, indique si los valores de la calibración fueron los adecuados para la muestra y si no fue así, explique por qué. Además, mencione si la técnica utilizada para la optimización fue clara y si existen algunas variaciones de la misma.

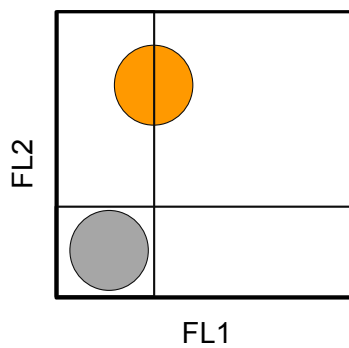
Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

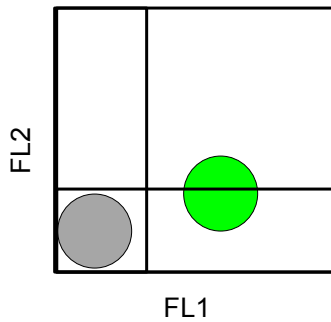
Cuestionario

1. ¿Por qué es importante la calibración de un citómetro de flujo?
2. ¿Cuál es la función de las microesferas plásticas?
3. ¿Cuáles son las funciones del *FACSComp*?
4. ¿Qué es la compensación?
5. ¿Por qué se debe hacer la optimización del equipo al leer muestras biológicas?
6. En los siguientes esquemas, indique cuál control de compensación debe mover para ajustar la señal en cada inciso y señale con una flecha si la resta debe incrementarse (↑) o disminuirse (↓), en el cuadro correspondiente.

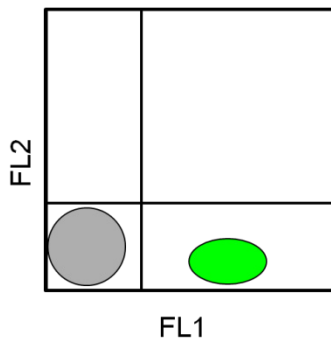
A)

FL1 - FL2 % FL2 - FL1 %

B)

FL1 - FL2 % FL2 - FL1 %

C)

FL1 - FL2 % FL2 - FL1 %

Bibliografía

Becton Dickinson. 1999. Operator Training Manual (BDIS). San José CA. EUA.

Baumgarth N. y Roederer M. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunology Methods*, 243: 77-97.

Hoffman R. 2005. Standardization, calibration, and control in flow cytometry. En: *Currents Protocols in cytometry*. John Wiley & Sons, Inc. 1.3.1-1.3.21pp.

Ormerod M.G. 2008. *Flow Cytometry: A Basic Introduction*. De Novo, EUA. 116 pp. Página electrónica disponible <http://flowbook.denovosoftware.com/>. Última consulta: 10 de enero de 2013.

Shapiro H.M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4 ed. Editorial Wiley-Liss, EUA.

Práctica 3

Separación de células por citometría de flujo

Introducción

La separación o clasificación de células (*"cell sorting"*, en inglés), utilizando citometría de flujo es el proceso de separación física de partículas con base en la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por citometría de flujo.

Este procedimiento permite seleccionar, separar y recuperar en forma íntegra y viable, subpoblaciones celulares purificadas con determinadas características de tamaño, granularidad o intensidad de fluorescencia.

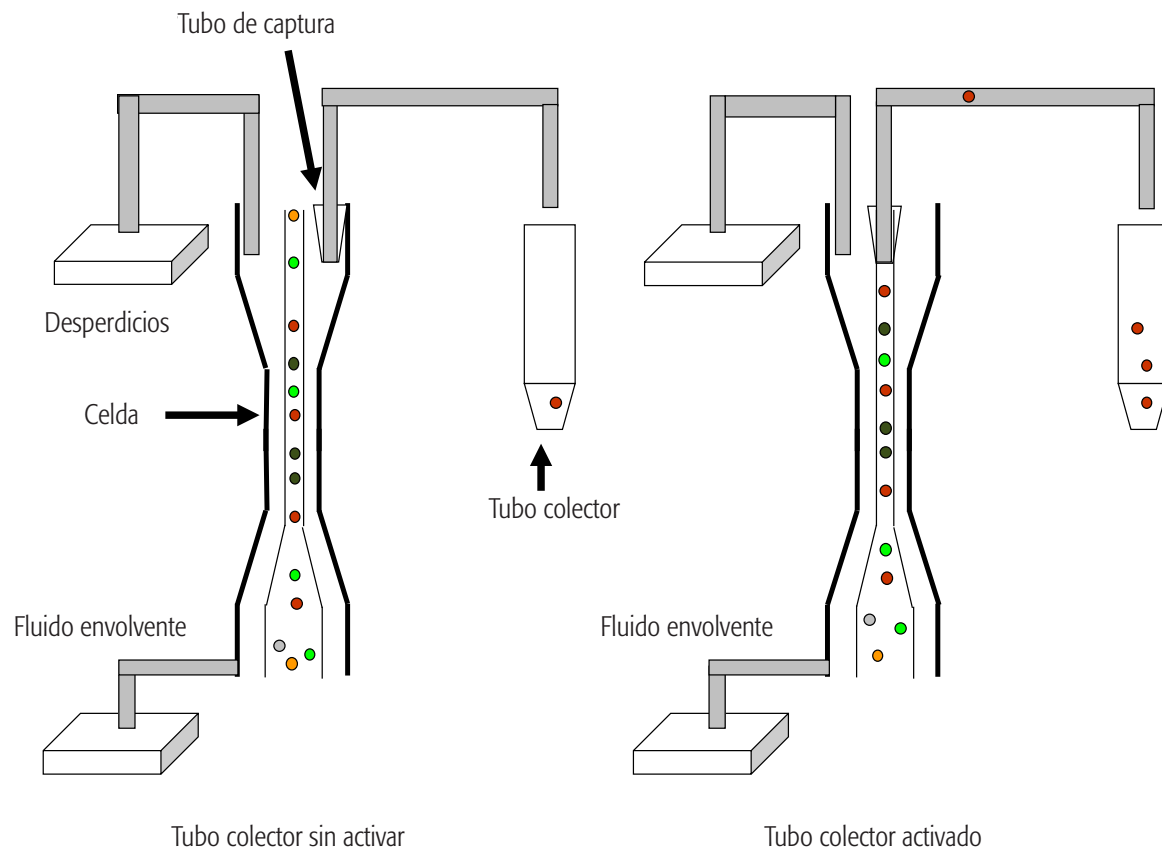
Estas separaciones o clasificaciones se realizan con la finalidad de llevar a cabo posteriormente ensayos bioquímicos, moleculares o de diferenciación celular de poblaciones de interés con una alta pureza, y requieren de la utilización de aparatos de citometría de flujo, denominados "cell sorters".

Se debe tener presente que para lograr una buena separación, es muy importante la elección adecuada de características celulares para identificar a las células. Para lograr este objetivo, es muy común, o necesario, el uso de anticuerpos fluorescentes contra receptores de membrana exclusivos de una población celular. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden identificar con anticuerpo anti-CD3 FITC.

Básicamente hay dos procedimientos para separar células, cada uno con sus ventajas y desventajas:

- Deflexión electrostática: consiste en la generación de gotas cargadas con la célula seleccionada. Estas gotas pasan por placas cargadas que las dirigen a los tubos de recuperación. La ventaja principal, es la alta viabilidad de las células separadas, y la principal desventaja, es el uso complejo de equipos grandes.
- Mecánica o hidráulica: En este caso, se hace uso de un tubo de captura colocado sobre la celda. Cuando se selecciona una célula, el tubo se activa y se coloca sobre la corriente de la muestra, para desviar a la célula a los tubos de recuperación. La principal ventaja de este método es el uso fácil de éste método. La principal desventaja es la baja concentración celular, debido a que el tubo de captura desvía fluido envolvente mientras espera a la célula seleccionada para separación.

En el caso del citómetro *FACSCalibur*, la separación de células es por el procedimiento mecánico. En la figura 1 se representa el mecanismo del tubo de captura descrito anteriormente. La capacidad de separación está limitada a 300 movimientos/seg del tubo de captura.



Representación esquemática de la separación hidráulica utilizada por el citómetro *FACSCalibur*.

A continuación se describen algunas características de este tipo de separación:

Estación de colección

Es el lugar donde las células separadas se recuperan. Las células viajan desde el tubo de captura por medio de las líneas de captura (mangueras plásticas muy delgadas), hasta los tubos de 50 ml. Éstos están dispuestos en tres puertos de colección (Figura 2). Se comienza a coleccionar en el tubo del puerto 1, el de extrema izquierda, y cuando se llena, el citómetro lo detecta y automáticamente comienza a coleccionar a las células en el tubo del puerto 2. Si la colección de las células continúa hasta llenar el tercer tubo, las células se dirigen al recipiente de desperdicios.

El botón de purga funciona para revisar que las líneas de separación están libres, es decir destapadas, para la separación. También se usa para limpiarlas al final de la separación.

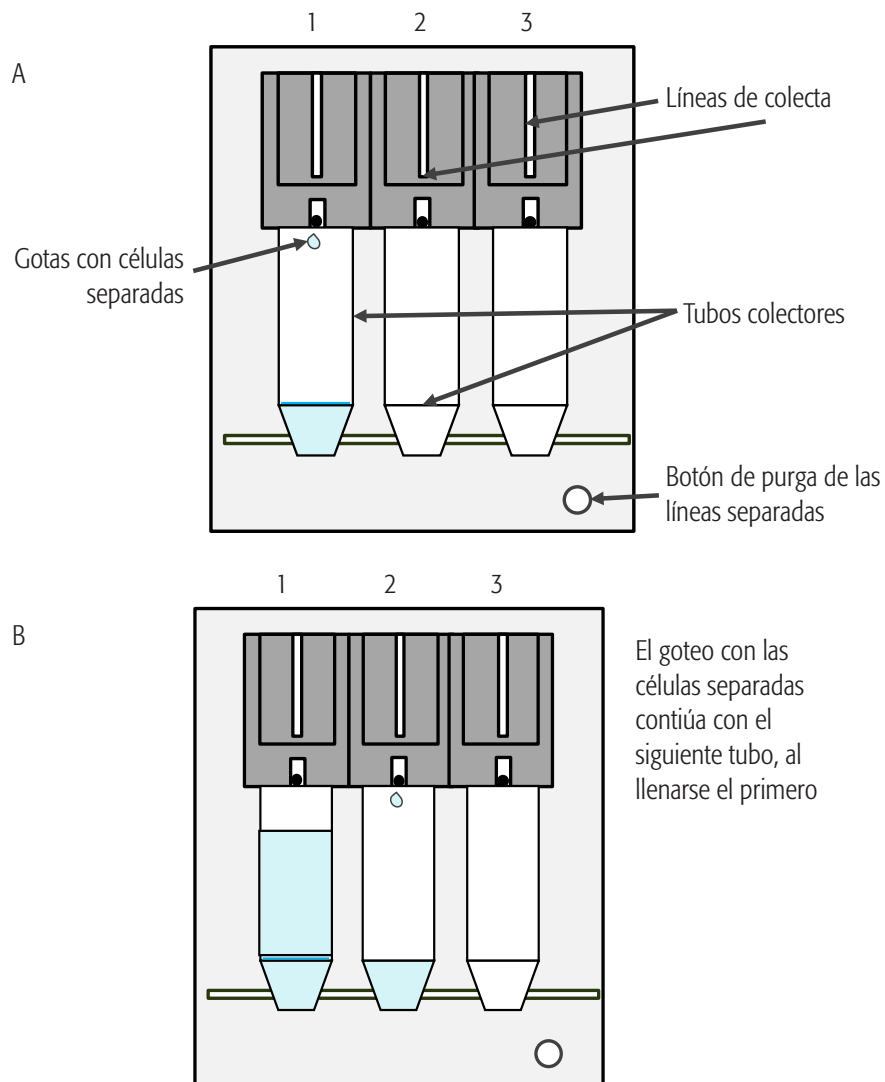


Figura 2. Esquemas que muestran la estación de colección.

Modos de separación

El sistema del *FACSCalibur* permite tres modos (mode sort) de separación. El modo de separación determina si una célula será separada o no cuando aparece un conflicto. Es importante tomar en cuenta tanto la pureza de la población deseada, así como el porcentaje de recuperación.

Los modos de separación se basan en control del movimiento del tubo de captura. La cubierta de separación (*sort envelope*) es el volumen de la corriente de la muestra que el tubo de captura colecta al seleccionar a la célula deseada. El tamaño de la cubierta depende del tiempo en que el tubo permanezca en la corriente de la muestra para capturar a la célula.

- Célula única: o "*Single cell*" por el nombre en inglés, la separación se hace solo si la célula seleccionada está sola y se descarta cuando en la cubierta de separación está acompañada de otra, sea diferente o igual a ella. El resultado es una muestra con alta pureza.
- Recuperación: o "*Recovery*" por el nombre en inglés, la célula deseada se separa, aun cuando esté con otra célula igual o distinta en la cubierta de separación. El resultado es una muestra con la mayor concentración de células posible, con menos énfasis en la pureza.

- Exclusión: La célula es separada cuando está sola en la cubierta de envoltura, o cuando está con otra célula igual en la cubierta de separación. Solo se descarta cuando está acompañada de otra distinta, es una célula distinta a la deseada o que está en una cubierta de separación muy reducida. El resultado es una muestra con una alta pureza y una concentración celular intermedia entre las opciones de *Single Cell* y *Recovery*.

La concentración de la muestra depende de dos factores principales: la concentración celular inicial y el modo de separación. La concentración recomendada es de 1.0×10^7 células/ml, ya que en la velocidad baja (*LOW*), recomendada para la separación, se logra una velocidad de la muestra de 2000 eventos por segundo y se alcanza la velocidad máxima de separación, 300 eventos separados por segundo, es decir 300 movimientos del tubo de captura por segundo. Si la concentración de células inicial es insuficiente para lograr estas velocidades, lo recomendable es concentrar la muestra por centrifugación. Además, si el porcentaje de la población de interés es menor al 30% de la población total, la velocidad de separación será menor de 300 eventos separados por segundo, aun cuando la velocidad de la muestra sea de 2000 eventos por segundo.

En relación con los modos de separación, el modo *Single Cell* tiene la menor velocidad de separación, porque los criterios para separar a la célula son más estrictos, mientras que el modo *Recovery* es que tendría mayor velocidad, aunque su pureza es baja en comparación a los otros modos de separación.

Objetivo

Al término de la práctica, el alumno será capaz de separar células con alta pureza, basándose en características de la población deseada.

Material requerido

1 pipeta graduada de 5ml

1 propipeta

1 pipeta pasteur

1 vaso de precipitado de 50 ml

1 vaso de precipitado de 100 ml

4 tubos de poliestireno de 5 ml

1 gradilla

1 agitador (vórtex)

Microesferas para calibración

Solución envolvente comercial ó amortiguadora de fosfatos (3 litros aproximadamente)

Muestra de células de la práctica anterior*

Tubos cónicos de polipropileno de 50 ml para centrifuga

Solución de albúmina sérica bovina al 4%, en solución salina de fosfatos, con azida de sodio al 0.1%, previamente preparada y a 4°C**

Centrifuga refrigerada

Citómetro *FACSCalibur*

*En caso de no tener disponible una muestra de células, se pueden usar microesferas de calibración.

**Si se usan microesferas de calibración, se puede prescindir de esta solución.

Material biológico

Células en suspensión en una concentración 1.0×10^7 células/ml.

Método o desarrollo

Pasos previos a la separación de células

Una vez calibrado el equipo, siga los siguientes pasos:

1. Proceda a la calibración del equipo como en la práctica anterior.
2. Instale un tubo de solución de fosfatos en el puerto de inyección y reemplace el tanque de fluido con un tanque con solución de fosfatos.
3. Instale un tubo de 50 ml en el primer puerto de colección.
4. Presione el botón de purga de líneas de separación.
5. Remueva el tubo de 50 ml y colóquelo en el segundo puerto.
6. Presione nuevamente el botón de purga.
7. Ponga el control de fluido en *Standby*.

Selección de la población celular

Varios términos están escritos en inglés, dado que son opciones del programa *CellQuest*.

1. Abra *CellQuest* y elabore la hoja de adquisición, según los fluorocromos usados para identificar la población.
2. Optimice el equipo, realizando la compensación adecuada para observar adecuadamente la población deseada (como en la práctica anterior).
3. Construya la región necesaria (o las regiones) para encerrar la población deseada, usando la herramienta *Polygonal* de la paleta de herramientas.
4. Elija del menú *Gates* la ventana de lista *Gate List*.
5. Cambie la definición de G3. Dé doble clic en R3, y el campo se señalará (cambiando de color). Escriba R1 AND R2. Presione la tecla de *Return*.
6. Cierre la ventana *Gate List*.

Colectando el archivo de datos pre-separación

1. En la ventana de *Parameter Description*, elija un folder y nombre de archivo para la muestra.
2. Oprima el botón *Parameters Saved* en la ventana de *Acquisition and Storage*.
3. Quite la selección de P6:FL(X)-A y P7:FL(X)-W.
4. Quite la selección de *Setup* en la ventana de *Acquisition Control*.
5. Elija del menú *Acquire a Sort Setup*.
6. Seleccione G3 = R1 AND R2 del menú *Sort Gate* (dentro de la ventana *Sort Setup*).
7. Escriba cero (0) en el campo del *Sort Count*.
8. Del menú *Sort Mode*, seleccione *Exclusion*.
9. En el menú *Aborted cells*, seleccione la forma *No List*.
10. Dé clic en *OK*
11. Elija *Sort counters* del menú *Cytometer*.
12. Seleccione *Threshold Total* del menú superior de la ventana *Sort Counters*.

13. Seleccione de la parte media *Sort Total*.
14. En la misma ventana, seleccione *Sort Rate*.

Separación de células

1. Asegúrese de que en *Acquisition Control* esté seleccionado *Setup*.
2. Instale en el puerto de colección al tubo con la cubierta de albúmina.
3. En el instrumento asegúrese de que el control de velocidad de fluido esté en bajo (*LOW*).
4. Ponga el control de fluido en *RUN*.
5. Coloque el tubo de la muestra en el puerto de inyección.
6. Oprima *Acquire* en la ventana del *Acquisition Control*.
7. Cuando esté completada la separación, oprima *Pause* en la ventana del *Acquisition Control*.
8. Quite el tubo de la muestra y coloque un tubo con agua destilada en el puerto de inyección.
9. Ponga el control de fluido en *Standby*.
10. Retire los tubos de colección.
11. Limpie las líneas de separación como se indica en el manual de entrenamiento del citómetro *FACSCalibur*.
12. Opcional: realice separaciones adicionales, modificando el punto 8 de la sección "Colectando el archivo de datos pre-selección" a otras modalidades de separación.

Concentración de la muestra y comprobación de pureza

1. Centrifugue los tubos con la muestra colectada a 300xg por 5 minutos.
2. Retire el sobrenadante usando una pipeta Pasteur y un sistema de vacío, cuidando de no alterar el botón celular.
3. Agite el botón y resuspenda en 0.5 ml de solución de fosfatos.
4. Transfiera la suspensión en un tubo de 5 ml.
5. Colecte un archivo de datos con sus células separadas, usando su propio documento de adquisición.
6. Después de haber guardado su archivo de datos, modifique en sus gráficas a gráficas de análisis y seleccione *No Gate*.
7. Busque su archivo de datos de las células separadas en ambas gráficas.
8. Elija *Gate Stats* en ambas gráficas.
9. Observe el porcentaje del *Gated* o del *Total*, en el cuadro de Stats. Los porcentajes deben ser los mismos.

Nota: Los tubos para la colección de las células separadas, deben estar previamente en refrigeración con la solución de albúmina. Cuando se tengan que utilizar, solo cambie la solución de albúmina a otro tubo y mantenga en refrigeración.

Resultados

En el programa CellQuest muestre en gráficas de puntos la muestra adquirida antes de la separación y después de la separación. Si realizó separaciones en las modalidades *Single Cell*, *Recovery* y *Exclusion*, obtenga las gráficas de cada una.

En un cuadro muestre el porcentaje de la población antes de la separación y después de la separación. Compare la pureza obtenida en cada una de las modalidades probadas.

Análisis de Resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos, analice cuál es la modalidad en la que se obtiene mayor pureza. También mencione las ventajas y desventajas de este método de separación celular, en comparación a otros. Además, mencione la importancia de obtener poblaciones puras de células.

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

Cuestionario

1. Indique en qué consiste la separación de células o "cell sorting" por citometría de flujo
2. Explique cuál es el fundamento básico para llevar a cabo la separación de células.
3. ¿Con qué propósito se lleva a cabo la separación de células?
4. En el siguiente cuadro, enumere las ventajas y desventajas de los procedimientos existentes para separar células.

	Deflexión electrostática	Mecánica o hidráulica
Ventajas		
Desventajas		

5. Describa brevemente el proceso de separación mecánica
6. En el siguiente cuadro, describa las características de los tres modos de separación que se pueden llevar a cabo con el sistema del *FACSCalibur*

Método		
Célula única	Recuperación	Exclusión

7. Mencione los factores implicados en la eficiencia de la separación de células.

Bibliografía

Becton Dickinson. 1999. Operator Training Manual (BDIS). San José CA. EUA.

Dean P.N. y Hoffman.R.A. 2007. Overview of flow cytometry instrumentation. En: Current Protocols in Cytometry. Wiley-Liss Publication, New York, EUA. 1.1.1-1.1.8.

Leary J.F. 1997. High-speed cell sorting. En: Currents Protocols in cytometry. John Wiley & Sons, Inc. 1.7.1-1.7.7pp.

Nunez R. 2001. Flow Cytometry: Principles and Instrumentation. Curr. Issues Mol. Biol., 3(2): 39-45.

Ormerod M.G. 2008. Flow Cytometry: A Basic Introduction. De Novo, EUA. 116 pp. Disponible en línea en: <http://flowbook.denovo-software.com/> (consultado el 15 de julio de 2012).

Práctica 4

Análisis del contenido de ADN

Introducción

El análisis de las diferentes fases del ciclo resulta importante para diferentes campos de la biología y medicina. Para lograr este fin se han implementado diferentes técnicas citogenéticas y citofluorométricas. En el caso de la citometría de flujo, la cuantificación del contenido del ADN en la células ha permitido identificar en qué estado del ciclo celular se encuentran, lográndose por esta metodología un análisis en mucho menos tiempo que con otras técnicas.

El ciclo celular puede reflejarse en una curva que muestre las variaciones del contenido de ADN versus el número de células analizadas. La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G_0) y en fase de pre-síntesis de ADN (G_1), produce un pico con distribución normal (**Figura 1**). De la misma forma, las células en G_2 , que tienen duplicado su ADN con respecto a las células en G_1 , también producen un pico distribuido como una normal. Los mismos factores que afectan la amplitud de los picos G_0G_1 y G_2+M , también afectan la amplitud de la fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células que inician la fase S se superponen con las células G_1 , como también lo hacen las células al final de la fase S con las células en G_2 .

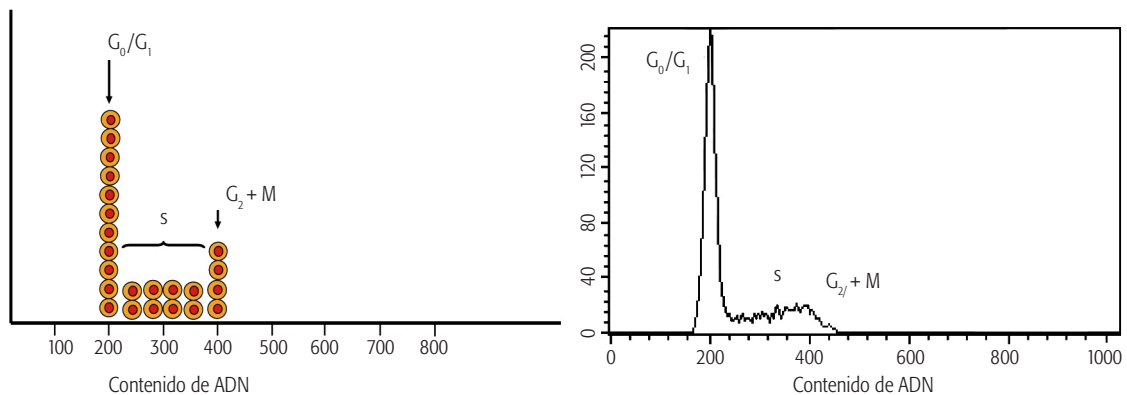


Figura 1. Gráfica del contenido de ADN. A) Representa el histograma ideal de la distribución de células por su contenido de ADN. B) Histograma de distribución de una muestra de células de bazo de ratas.

Las células normales tienen un número $2n$ de cromosomas, es decir son diploides. Un número anormal de cromosomas, característicos de células tumorales, se denomina aneuploidía y refleja cambios en el contenido de ADN.

El contenido de ADN de una población celular se expresa como el índice de ADN, el cual se define como la razón entre el contenido de ADN de la población celular en estudio con respecto a células normales o células control.

El análisis del contenido del ADN se basa en el principio de los colorantes específicos para ADN deben teñir a éste en una manera estequiométrica, es decir, la cantidad de fluorescencia detectada en la célula analizada, es directamente proporcional a la cantidad de ADN, y por lo tanto se puede usar esta información para determinar la fase del ciclo celular. Existen diversas moléculas intercalantes de los ácidos nucleicos que cumplen con este requisito, teniendo ventajas unos sobre otros.

Se han descrito una gran cantidad de técnicas para medir el contenido de ADN, en las que se toma en cuenta la fuente celular (células animales, vegetales, etc), las condiciones en las que se encuentra, así como el tipo de intercalante más conveniente, según las especificaciones del citómetro o las necesidades del ensayo.

Además del análisis del contenido de ADN, es posible evaluar de forma rápida y eficiente diferentes aspectos relacionados con el ciclo celular como: duplicación del ADN, análisis de ploidías, estudio de proteínas asociadas con la proliferación, detección de ciclinas y de otros componentes relacionados con la regulación del ciclo celular.

Objetivo

Cuantificar células en diferentes fases del ciclo, utilizando citometría de flujo.

Objetivos particulares

Calibración del citómetro de flujo con núcleos de eritrocitos de pollo y de timo de ternera.

Análisis del ciclo celular de una muestra biológica.

Material requerido

1 micropipeta de 1000 μ l

1 pipeta graduada de 5 ml

1 propipeta

1 pipeta Pasteur

1 vaso de precipitado de 50 ml

1 vaso de precipitado de 100 ml

6 tubos de poliestireno de 5 ml

1 gradilla

1 Agitador (vórtex)

Microesferas *Calibrite* 3 colores.

Partículas *DNA QC*

Kit "*Cicle TEST PLUS DNA Reagent*"

Solución envolvente comercial ó solución amortiguadora de fosfatos (3 litros aproximadamente)

Material Biológico

Células en suspensión proporcionada por el profesor.

Notas de seguridad. Revise las hojas de seguridad de las sustancias químicas previamente. Los alumnos deben usar guantes de látex y bata 100% algodón.

El **yoduro de propidio** es una sustancia potencialmente **mutágena** y **cancerígena**, por lo que todos los sobrantes de las muestras y las partículas CEN y CTN, se colectan en un recipiente de plástico para eliminarlo por medio del programa "Laboratorio Seguro" de la UAM-Iztapalapa. También se colectan los tubos de plástico, las puntas de micropipetas y guantes que hayan estado en contacto con soluciones de yoduro de propidio.

Método o desarrollo

Etapas del procedimiento

- a) Preparación de la muestra.
- b) Obtención de núcleos y tinción.
- c) Calibración del equipo.
- d) Optimización y adquisición de datos de ADN en el citómetro.

A. Preparación de la muestra:

Es factible obtener una muestra de núcleos de diferentes fuentes:

- Suspensiones celulares como: sangre periférica, líneas celulares, médula ósea.
- Tejidos sólidos, tumores sólidos, aspirados con aguja fina.
- Tejido en parafina: Cortes de bloques

Es importante mencionar que las células deben estar en suspensión celular, para ello las muestras de tejidos sólidos se disgregan previamente, en general empleando enzimas como la pepsina.

A continuación se describen los pasos necesarios de preparación, si la muestra proviene de sangre periférica o un cultivo de sangre completa.

1. Obtener 1 ml de sangre con ayuda de una jeringa heparinizada. Vaciar en un tubo de 5 ml.
2. Tomar 200 μ l y colocar en un tubo de 5ml.
3. Añadir a la sangre 4 ml de solución de lisis en agitación.
4. Dejar reposar 10 min.
5. Centrifugar a 500 xg por 5 min.
6. Quitar el sobrenadante. Si el botón se ve rojo aún, repetir desde el paso 2.
7. Si el botón celular se ve blanco o con muy poco color rojo, añadir 2 ml de PBS. (Solo se recomienda lisis dos veces, si es necesario).
8. Centrifugar a 500 xg y retirar el sobrenadante.
9. Añadir 1 ml de PBS y resuspender.
10. Realizar el conteo de la concentración celular con un hematocitómetro y solución de Turk. La concentración necesaria es de 0.5×10^6 células/ml a 1.0×10^6 células/ml
11. Si es necesario, tomar otros 200 μ l de sangre y repetir los pasos del 3 al 10 y juntar las dos muestras.

B. Procedimiento para la obtención de núcleos y tinción de la muestra

Se utiliza el Kit "Cicle TEST PLUS DNA Reagent". Las soluciones que contiene son:

- A: Tripsina en un amortiguador (tetracloruro de espermina). Para la disgregación de fragmentos de tejido y digestión de las membranas celulares y citoesqueleto.
- B: Inhibidor de tripsina y ribonucleasa A (en un amortiguador de citrato de tetracloruro de espermina). Para inhibir la tripsina y para digerir el ARN.
- C: Yoduro de propidio (IP) y tetracloruro de espermina en amortiguador de citrato. El IP se une estequiométricamente al ADN en una concentración final 125 µl/ml.

Se siguen los siguientes procedimientos para la obtención y la tinción de los núcleos:

1. Centrifugar la suspensión celular a 400 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Decantar cuidadosamente todo el sobrenadante.
2. Añadir 250 µl de la solución A (amortiguador con tripsina) a cada tubo y mezclar suavemente con la pipeta (no usar vórtex).
3. Incubar con la solución A por 10 minutos a temperatura ambiente. No se debe remover la solución.
4. Añadir 200 µl de la solución B (amortiguador con inhibidor de la tripsina y ribonucleasa) a cada tubo y mezclar suavemente con la pipeta (no usar vórtex).
5. Incubar con la solución B por 10 minutos a temperatura ambiente. No se debe remover la solución.
6. Añadir 200 µL de solución C (solución de tinción, IP) a cada tubo. La solución de IP debe estar fría (2 a 8° C). Mezclar suavemente e incubar por 10 minutos en oscuridad en el refrigerador o en hielo.
7. Filtrar la muestra a través de una maya de nylon de 50 a 100 µm. Colectar el filtrado en un tubo.
8. Las muestras se pueden analizar en el citómetro de flujo dentro de las 3 horas después de la adición de la solución C. Se recomienda no exceder este tiempo. **Nota: Se ha trabajado con muestras tratadas con este kit al día siguiente.**

C. Calibración del equipo.

Para la calibración del equipo se emplearán las partículas "DNA QC"

- A: Suspensión de CEN en amortiguador y etanol.
- B: Suspensión de CTN en amortiguador con formaldehído y timerosal al 0.01%.
- C: Perlas fluorescentes de 2 µm en amortiguador con gelatina y azida de sodio al 0.1%.
- D: Yoduro de propidio en amortiguador, concentración 50 µg/ ml.

Partículas CEN: Son núcleos fijados de eritrocitos de pollo que se usan como control de calidad para el aparato. Están preparados como núcleos simples, dobles, triples y algunos agregados mayores. Son útiles para probar la discriminación lineal y la resolución del aparato.

Método de preparación:

1. Agitar suavemente con un agitador de tipo vórtex.
2. Poner en un tubo 1ml de yoduro de propidio (concentración: 50 (µg/ml).
3. Agregar una gota de las partículas al tubo (40 µl).
4. Tapar y agitar suavemente en un vórtex.
5. Incubar por 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente.
6. Guardar en oscuridad y a temperatura de 2 a 8° C, hasta su uso (son estables durante 4 horas)

Partículas CTN: Son núcleos aislados de timocitos de ternera, los cuales están en las diferentes fases del ciclo celular. Permiten detectar la discriminación precisa de dobletes. Se emplean también para determinar la adecuada detección de las células en las diferentes fases del ciclo celular.

Método de preparación:

1. Agitar vigorosamente en un vórtex
2. Poner en un tubo 1ml de yoduro de propidio (concentración: 50 (µg/ ml)
3. Agregar una gota de las partículas al tubo (40 µl).
4. Tapar y agitar suavemente en un vórtex
5. Incubar por 10 min, en oscuridad y a temperatura de 2 a 8° C, hasta su uso (son estables durante 4 horas).

Adquisición de las partículas para la calibración del citómetro.

1. Se abre el programa CellQuest para adquisición y se abre el documento de adquisición *CellQuest DNA Experiment* del folder *DNA QC*.
2. Ajustar el equipo con las partículas CEN y adquirir en velocidad *LOW* en el programa *CellQuest* y la hoja de adquisición *DNA Experiment* del folder *DNA QC*.
 - a. Asegurarse de colocar el pico de las partículas simples en el canal 200 ± 5 en el histograma del parámetro FL2-A y en el de FL2-W, ajustando con los controles de voltaje PMT de FL2 y el porcentaje de la ganancia de la amplificación FL2-W en el menú "*Detectors/Amps*".
 - b. Anotar los datos del canal promedio para marca uno (M1) y para la marca 2 (M2), del cuadro de estadística del histograma FL2-A.

D. Optimización y adquisición de datos de ADN en el citómetro.

1. Se abre el documento *PBMC Experiment* desde el folder *DNA QC*.
2. Crear una gráfica de puntos FL2-W vs FL2-A, en modo "aquisition" → *analysis*.
3. Del menú *Acquire*, elija *Parameter Description*. Elija el folder en donde desea guardar su archivo de datos y el nombre del mismo.

4. Escriba el nombre de su muestra en el cuadro de "Sample ID" en "Parameter Description".
5. Ponga el instrumento en velocidad baja (*LOW*) y en modo *RUN*. Coloque el tubo con la muestra en el puerto de inyección.
6. Ajuste el voltaje de FL2 PMT, en modalidad "Setup" para colocar el pico de la población G₂ + M en el canal 200 ± 5, en el histograma FL2-A.
7. En la gráfica de puntos FL-2W vs FL2-A, observe que se distinga la población de núcleos G₂ + M de los dobletes. Si no es así, ajuste la ganancia de FL2-A.
8. Oprima pausa y pare la adquisición Quite la selección de *Setup*.
9. Agite la muestra si es necesario e inicie la adquisición y guarde 20 000 eventos.

Resultados

En la hoja de adquisición DNA Experiment Document, llame el archivo de las partículas CEN en el histograma FL2-A y calcule la linealidad. Se obtiene el canal promedio para marca uno (M1) y para la marca 2 (M2), del cuadro de estadística y se hace la siguiente relación:

$$\text{Promedio M2/ Promedio M1} = \text{linealidad}$$

El resultado debe ser entre 1.95 a 2.05.

Obtenga el CV de M1 en el cuadro de estadística del histograma FL2-A, el cual debe ser menor a 3.00 %. Tanto la linealidad como el CV son datos importantes para el seguimiento del funcionamiento del citómetro.

En cuanto a las partículas CTN y la muestra, se analizan en el programa *ModFit LTM*. Obtenga las proporciones de las células en cada una de las fases del ciclo.

Análisis de resultados

Haga un análisis de los resultados obtenidos. Explique qué importancia tiene la linealidad y el CV de las partículas CEN.

Analice los porcentajes de células en cada fase del ciclo de las partículas CTN y observe si coincide con los datos del fabricante. Explique la importancia de estas partículas en el funcionamiento del citómetro.

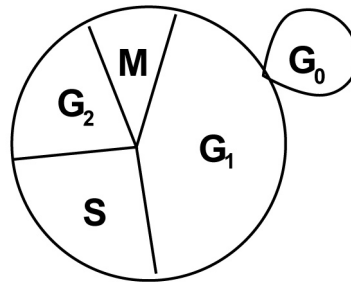
De la muestra de células, observe el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo y analice si corresponde al tipo de celular, es decir, si es una población celular con alta proliferación o baja. Así mismo, diga qué se observaría en una población que en diferentes condiciones: en un organismo en crecimiento, en cáncer, etc.

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

Cuestionario

1. Explique brevemente los eventos que ocurren en cada fase del ciclo celular.
2. La cantidad de ADN de un organismo diploide ($2n$) varía de acuerdo a la progresión del ciclo celular. En la siguiente figura, indique la cantidad de ADN correspondiente a cada fase del ciclo celular.



3. El siguiente histograma muestra el contenido de ADN característico de cada fase del ciclo celular. Indique que fase del ciclo celular representa cada pico y explique el significado biológico de la superposición de las células que inician la fase S con las células que están en G_1 , así como la superposición de células al final de la fase S con las células que están en G_2 .



4. Explique por qué razón las aneuploidías se relacionan con alteraciones en el contenido de ADN.

5. En la siguiente tabla, haga una lista de moléculas intercalantes de los ácidos nucleicos y mencione las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Molécula intercalante	Ventajas	Desventajas

6. Defina brevemente, qué es el coeficiente de variación.
7. Explique cuál es el significado biológico del coeficiente de variación.
8. Indique la relación existente entre la tasa de proliferación celular, el contenido de ADN y la progresión del ciclo celular.

Bibliografía

- Becton Dickinson. 1999. Operator Training Manual (BDIS). San José CA. EUA.
- Becton Dickinson. 1994. Cycle TEST™ PLUS DNA reagent kit. For analysis of nuclear DNA from solid tissue or cell suspension. San José CA. EUA.
- Darzynkiewicz Z., Juan G. y Bedner E. 1999. Determining cell cycle stages by flow cytometry. En: Current Protocols in Cell Biology: 8.4.1-8.4.18
- Ortiz R., Rodríguez L., Cortés L., Nájera O., Rodríguez E. y Cortés E. 2006. Estudios con citometría de flujo. Inmunofenotipo, proliferación, diferenciación, muerte celular y análisis de ADN. En: Tópicos de Genética. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 345-366 pp.
- Ormerod M.G. 2008. Flow Cytometry: A Basic Introduction. De Novo, EUA. 116pp. (<http://flowbook.denovosoftware.com/>)
- Rabitnovich P. 1993. Practical Considerations for DNA Content Cell Cycle Analysis. In: Clinical Flow Cytometry: Principles Applications. Bauer Ketal (eds), W y W, Baltimore. pp 117-42.
- Shankey T.V., Rabitnovich P, Bagwell B, Bauer K, Duque R, Hedley D. (1993), Guidelines for Implementation of Clinical DNA Cytometry. Cytometry.14: 472-7
- Wersto RP, Liblit RL, Deitch D, Koss LG. (1991). Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. Cancer.67: 106-15.

Práctica 5

Determinación de la viabilidad celular

Introducción

La mayoría de las aplicaciones de la Citometría de Flujo se basan en el monitoreo o medición de la fluorescencia. Algunas de las aplicaciones más comunes utilizando fluorocromos son el análisis de la viabilidad celular y el estado fisiológico.

La determinación de la viabilidad celular es el conteo de las células vivas (sanas) o muertas en una muestra. Generalmente los métodos de determinación de la viabilidad se basan en el análisis de dos parámetros: actividad metabólica de la célula o integridad de membrana plasmática. Genéricamente se considera que la clonogenicidad o viabilidad reproductiva son sinónimos de viabilidad celular. Lo anterior presenta dos notables desventajas:

1. La definición de viabilidad en términos de capacidad reproductiva, excluye a células completamente diferenciadas y funcionales como es el caso de células nerviosas y musculares en el caso de eucariontes, y a células vegetativas en el caso de procariontes. En esta situación, la preservación de alguna función celular estaría más acorde con el criterio de viabilidad celular.
2. Mientras que la reproducción celular en un cultivo proporciona una evidencia inequívoca de viabilidad, la falla en reproducir células se puede deber a una falla en el método usado más que a un daño celular.

En 2003, Shapiro propuso usar el término de “células intactas”, para describir a células que no han sido tratadas con fijadores o agentes lisantes, y que no muestran una alteración morfológica y funcional. Entre los parámetros considerados como característicos de células intactas, se encuentran la integridad, permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática, así como, el potencial de membrana y el pH.

Una de las formas de evaluar la integridad de la membrana, es el uso de colorantes de exclusión o colorantes de retención. Los colorantes de exclusión tiñen los ácidos nucleicos de las células con membranas deterioradas y los de inclusión generalmente utilizan sustratos fluorescentes que son degradados por las enzimas intracelulares y que generan productos fluorescentes (Riesberg, 2001).

Las células vivas con membranas intactas se caracterizan por su habilidad para excluir colorantes que fácilmente penetran la membrana plasmática de células muertas o dañadas. La tinción de células no viables con yoduro de propidio ha sido ampliamente probada en diversos tipos celulares. Su amplia aplicación se debe a que es un procedimiento fácil de realizar y las células teñidas son fácilmente identificadas. Alternativamente, el uso de 7-amino actinomicina D (7-AAD), facilita el uso conjunto de marcadores de superficie conjugados con ficoeritrina (PE) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para poder teñir o marcar constituyentes no localizados en la superficie de células intactas, un fluorocromo debe ser capaz de cruzar la membrana celular. La mayoría de los colorantes descritos como tinciones vitales son pequeñas moléculas que son relativamente solubles en lípidos, y están cargadas positivamente o son eléctricamente neutras a pH fisiológico. Una alta solubilidad en lípidos favorece el paso desde un medio acuoso a la fase lipídica de la bicapa de la membrana celular. Los compuestos orgánicos que contienen al menos dos cargas positivas (como el DAPI), son impermeables a las membranas intactas. El bromuro de etidio (BrEt), comparte la estructura de anillo heterocíclico del yoduro de propidio (IP), pero sólo presenta una carga positiva. Ambos fluorocromos forman complejos con ADN y ARN, y son tóxicos para las células, una vez que son internalizados. Sin embargo, el BrEt, entra normalmente en la célula y es expulsado al exterior por algunas bacterias, mientras que el IP es excluido por su carga positiva adicional (Guindulain y col., 2002).

En esta práctica se proponen dos métodos para evaluar viabilidad usando colorantes de exclusión: el IP y el uso de 7-AAD.

En la actualidad, la evaluación de la viabilidad celular tiene una amplia aplicación en la toxicología debido a que alcanza enorme trascendencia social por el importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada “toxicología reguladora”, rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como acciones de salud pública.

Objetivo

Determinar la viabilidad celular de una muestra biológica utilizando citometría de flujo.

Material requerido

Material

Tubos de poliestireno de 5 ml

Gradilla

Micropipetas de 10 μ l

Micropipetas de 1000 μ l

Hielo

1 vaso de precipitado de 100 ml

2 pipetas graduadas de 5 ml

1 centrífuga clínica con canastillas para tubos de 5 ml

Material Biológico

Células en suspensión proporcionada por el profesor: Se extraerá 1 ml de sangre periférica, y se procederá a lisar eritrocitos para medir viabilidad celular en linfocitos.

Soluciones

IP en PBS (2mg/ml) (puede ser almacenado a 4°C, debidamente cubierto y protegido de la luz hasta por un mes).

7-AAD en PBS (1mg/ml) (puede ser almacenado a 4°C, debidamente cubierto y protegido de la luz hasta por un mes).

Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4 (3 litros aproximadamente).

Solución de albúmina sérica bovina al 1% disuelta en PBS.

Solución de lisis: Pesar: 4.145 gr de NH_4Cl , 0.5 gr de KHCO_3 , 0.018 g de Na_2EDTA . Disolver en 400 ml de agua destilada. Ajustar pH a 7.2-7.4 con HEPES y aforar a 500 ml. Conservar a temperatura ambiente.

HEPES: Preparar: HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 anhidro 5mM. Disolver en agua. Ajustar el pH a 7.4.

NOTA DE SEGURIDAD: El IP y el 7-AAD son sustancias potencialmente mutágenas y cancerígenas, por lo que todos los sobrantes se colectan en un recipiente de plástico para eliminarlo por medio del programa “Laboratorio Seguro” de la UAM-Iztapalapa. También se colectan los tubos de plástico, las puntas de micropipetas y guantes que hayan estado en contacto con soluciones de IP y 7-AAD.

Las agujas y jeringas utilizadas deberán ser desechadas en el contenedor destinado para este fin (recipiente de punzocortantes), previa desinfección con agua clorada. Los alumnos deberán utilizar guantes de látex en todo momento, así como bata cerrada. En caso de contaminación con sangre humana, dar aviso inmediato al profesor.

Método o desarrollo

1. A 600 μ l de sangre completa, se le agregarán 4 ml de solución de lisis y se incubarán durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 200 xg durante 5 minutos.
3. Retirar el sobrenadante.
4. Resuspender en 4 ml albúmina sérica al 1%.
5. Centrifugar a 200 xg durante 5 minutos.
6. Resuspender en 4 ml de albúmina sérica al 1%.
7. Retirar el sobrenadante y resuspender el paquete en 1 ml de PBS.

Tinción con yoduro de propidio

Preparar una cama de hielo.

Colocar en un tubo de poliestireno aproximadamente 106 células lavadas y suspendidas en 1 ml de PBS.

Agregar 1 μ L de IP (concentración final: 2 μ g/ml).

En otro tubo colocar un millón de células en 1 ml de PBS.

Incubar durante 5 minutos en oscuridad en una cama de hielo.

En el programa Cell Quest, construya la hoja de adquisición.

Abrir los controladores de los detectores. Ponga la amplificación de FSC y SSC en lineal y de FL1 y FL2 en logarítmica.

Ajustar el voltaje de los PMT de FSC, SSC, FL1 y FL2 con la muestra sin marca.

Adquirir 20,000 eventos celulares de los tubos sin marca y con IP y analizar en el citómetro de flujo a 488 nm de excitación

a) El IP se excita a 488 nm. Las células muertas tendrán un espectro de emisión y pueden ser detectadas por medio de los fotomultiplicadores en modo logarítmico.

Tinción 7-AAD

Colocar en un tubo de poliestireno aproximadamente 1×10^6 células lavadas y suspendidas en 1 ml de PBS.

Agregar 1 μ l de 7-AAD (concentración final: 1 μ g/ml).

Incubar por 30 minutos en oscuridad en una cama de hielo.

En otro tubo colocar un millón de células en 1 ml de PBS.

En el programa Cell Quest, construir la hoja de adquisición.

Abrir los controladores de los detectores. Ponga la amplificación de FSC y SSC en lineal y de FL1, FL2 y FL3 en logarítmica.

Ajustar el voltaje de los PMT de FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3 con la muestra sin marca.

Adquirir 20,000 eventos celulares de ambos tubos y analizar en el citómetro de flujo a 488 nm de excitación.

Adquisición en el citómetro de flujo

Análisis de patrones de tamaño

Utilizando el programa de adquisición y análisis CellQuest se dibujarán las siguientes gráficas de análisis:

1. Se dibujará una ventana en función de la dispersión frontal de la luz (FSC) y de la dispersión lateral de la luz (SSC), de modo que más del 90% de los eventos celulares queden incluidos (Figura 1).

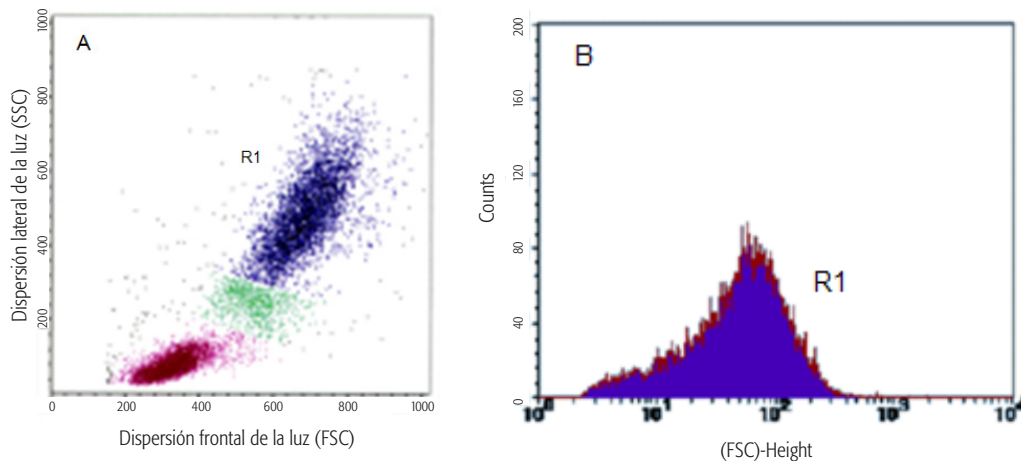


Figura 1. Selección de la región de análisis en función de FSC y SSC:
 A) Se selecciona una región de análisis (R1), de modo que se incluyan más del 90% de los eventos celulares. B) Posteriormente se analizan los datos contenidos en esta región, por medio de histogramas.

- 1.1 Los datos se expresarán en forma de canales. Los valores de canales en el citómetro de flujo *FACSCalibur* tienen un intervalo que va desde 0 hasta 1,023.
- 1.2 Cada histograma se dividirá en 8 marcadores consecutivos con un espacio de 100 canales cada uno.
- 1.3 Se utilizará el porcentaje de células en la región de análisis para todos los datos.
- 1.4 Para evaluar el intervalo de tamaños celulares de células detectadas en cada sección, se consideran intervalos de FSC-H que contengan un número significativo de eventos celulares, relacionado con el porcentaje de la región de análisis dentro de cada marcador y el número de eventos celulares.

Análisis de viabilidad

1. Utilizando el programa de adquisición y análisis CellQuest se dibujará una gráfica de análisis en función de FSC y SSC, de modo que más del 90% de eventos celulares queden incluidos.
2. Se evaluará la intensidad de fluorescencia roja del IP (FL2-H: mayor de 590 nm).
3. Se evaluará la intensidad de fluorescencia roja del 7-AAD (FL3-H: mayor de 640 nm)

Análisis de resultados

Análisis de viabilidad celular

1. Observar los histogramas obtenidos correspondientes a evaluación de viabilidad celular mediante la incorporación de IP.
2. En el histograma correspondiente al control positivo, se dibuja a la izquierda un marcador que incluyera el 95% de los eventos celulares y un marcador (a la derecha del histograma), que incluye como máximo un 5% de eventos.
3. Las células que están incluidas en este segundo marcador corresponden a las células que incorporaron IP, es decir, no viables.

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

Cuestionario

1. ¿Cómo se determina la viabilidad celular en un cultivo?
2. Explique cuáles son los parámetros utilizados para determinar la viabilidad celular
3. ¿Cuál es la diferencia entre los colorantes de exclusión y los colorantes de retención?
4. En la siguiente tabla anote las aplicaciones del uso de colorantes de exclusión y de inclusión:

Aplicaciones	
Colorantes de exclusión	Colorantes de inclusión

5. Explique el fundamento de la técnica de tinción celular con yoduro de propidio y 7-AAD.
6. Además de la toxicología, indique en que otros campos de la investigación tiene aplicación la determinación de la viabilidad celular.

Bibliografía

Guindulain T., Vives-Rego J. 2002. Involvement of RNA and DNA in the staining of Escherichia coli by SYTO 13. Letters Appl Microbiol 34: 1-7.

Reisberg M., Kasper C., Scheper T. 2001. Flow Cytometry in Biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol. 56: 350-360.

Shapiro H.M. 2003. Practical Flow Cytometry. 4 ed. Editorial Wiley-Liss, EUA.

Práctica 6

Inmunofenotipo

Introducción

La determinación del inmunofenotipo consiste en el análisis de poblaciones heterogéneas de células con el propósito de identificar la presencia y las proporciones de diferentes subpoblaciones de interés. Para este propósito se utilizan anticuerpos que son capaces de identificar a las células de interés mediante la detección de antígenos específicos, los cuales son expresados por estas células. Estos antígenos son conocidos generalmente como marcadores y en el caso de células del sistema inmunológico se conocen como clúster de diferenciación (CD). Dichos marcadores son generalmente proteínas funcionales de membrana que participan en la comunicación celular, la adhesión, o en el metabolismo (Ruiz-Argüelles y col., 2010).

Los CD representan una vía muy útil para identificar una subpoblación específica, sin embargo, frecuentemente éstos se expresan en más de un tipo celular. Por esta razón, en la citometría de flujo se han implementado estrategias de tinción que emplean dos o más anticuerpos simultáneamente, de tal forma que mediante la evaluación de estos anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos, una población de células puede ser identificada y cuantificada. Los fluorocromos más utilizados son la fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE). Generalmente se utiliza una mezcla de anticuerpos conjugados con los dos fluorocromos y se realiza el análisis directo de dos colores.

Como ya se mencionó, muchos marcadores de células inmunológicas son marcadores CD y estos se utilizan comúnmente para la detección en citometría de flujo de poblaciones específicas de células inmunológicas y subpoblaciones. Las principales subpoblaciones de linfocitos estudiadas en humanos son las células T (CD3+), células B (CD19+), células asesinas naturales o NK (CD16+ y/o CD56+), células cooperadoras o inductoras (CD4+) y células supresoras o citotóxicas (CD8+) (Ortiz y col., 1999).

El estudio de las subpoblaciones de linfocitos, empleando citometría de flujo ha propiciado la obtención de mayor información con relación a la función de los diferentes tipos de linfocitos. Esto ha permitido conocer mejor sus interacciones e identificar nuevos marcadores importantes en diferentes condiciones y padecimientos. Por otro lado, el análisis de las subpoblaciones de linfocitos permite evaluar el estado inmunológico del organismo, también proporciona información substancial para identificar diversos padecimientos, para valorar la condición de los pacientes con enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias, incluso se ha evidenciado que proporciona, en diferentes trastornos, datos con valor pronóstico (Sánchez, 2007).

La Inmunofenotipificación usando citometría de flujo se ha convertido en el método de elección en la identificación y clasificación de células dentro de poblaciones complejas, por ejemplo el análisis de las células inmunológicas en una muestra de sangre. Las aplicaciones de esta tecnología se utilizan tanto en la investigación básica como en laboratorios clínicos (Saavedra-Herrera y col., 2008).

Objetivo

Mediante identificación de inmunofenotipo, determinar el porcentaje de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de humanos,

Objetivos particulares

1. Determinar el porcentaje de linfocitos T4, T8, dobles positivos y la relación entre T4/T8.
2. Determinar el porcentaje de linfocitos T3, T4.
3. Determinar el porcentaje de linfocitos T y NK.
4. Determinar el porcentaje de linfocitos T y B.

Material requerido

Soluciones

1. Solución de lisis: Pesar: 4.145 gr de NH_4Cl , 0.5 gr de KHCO_3 , 0.018 gr de Na EDTA. Disolver en 400 mL de agua destilada. Ajustar pH a 7.2-7.4 con HEPES y aforar a 500 ml. Conservar a temperatura ambiente.
2. HEPES: Preparar: HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 anhidro 5mM. Disolver en agua. Ajustar el pH a 7.4.
3. PBS.

Material

6 Tubos de poliestireno de 5 ml

1 Gradilla

Micropipetas de 10 μl

Micropipetas de 100 μl

Micropipetas de 1000 μl

Pipetas de 5 ml

Matraz aforado de 2000 ml

1 vaso de precipitado de 50 ml

1 centrifuga clínica con dos canastillas para tubos de 5 ml

1 agitador (vórtex)

Reactivos

Isotipo

Anticuerpo CD4-FITC/CD8-PE

Anticuerpo CD3-FITC/CD4-PE

Anticuerpo CD3-FITC/CD16,56-PE

NOTA: De acuerdo a la disponibilidad de anticuerpos al momento de realizar la práctica, el profesor podrá elegir o decidir qué subpoblaciones celulares se trabajarán.

En caso de que no se cuente con todos los anticuerpos, los alumnos tendrán acceso al análisis de archivos generados en prácticas anteriores, los cuales se encuentran almacenados en el citómetro de flujo.

Material Biológico

Se extraerá 1 ml de sangre periférica por punción venosa usando heparina como anticoagulante. Se conservará a temperatura ambiente por no más de 6 horas.

NOTA DE SEGURIDAD: Las agujas y jeringas utilizadas deberán ser desechadas en el contenedor destinado para este fin (recipiente de punzocortantes), previa desinfección con agua clorada. Los alumnos deberán utilizar guantes de látex en todo momento, así como bata cerrada. En caso de contaminación con sangre humana, dar aviso inmediato al profesor.

Método o desarrollo

1. Etiquetar 6 tubos de acuerdo al siguiente cuadro:

Tubo	Anticuerpos	Utilidad
1	Control negativo (sin marca)	Análisis FSC-SSC. Identificación de región de linfocitos, monocitos y granulocitos
2	Control de isotipo	Análisis FL1-FL2: Reconocer fluorescencia inespecífica. Definir cuadrantes
3	CD4-FITC/CD8-PE	Determinar porcentajes de linfocitos T4, T8, dobles positivos y relación T4/T8
4	CD3-FITC/CD4-PE	Determinar porcentajes de linfocitos T3 y T4
5	CD3-FITC/CD16,56-PE	Determinar porcentajes de linfocitos T y NK
6	CD3-FITC/CD19-PE	Determinar porcentajes de linfocitos T y B

Cuadro 1. Estrategia de marcaje para identificar inmunofenotipo en linfocitos

2. A cada tubo agregar 10ml de la mezcla de los anticuerpos específicos.
3. Añadir 100 ml de sangre completa.
4. Incubar 15 - 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Agregar 4 ml de solución de lisis.
6. Incubar 10-12 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
7. Centrifugar a 300 xg durante 5 minutos.
8. Aspirar el sobrenadante
9. Agregar 2 ml de solución envolvente (*FACS flow*) o de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y resuspender el botón celular.
10. Centrifugar 200 xg 5 minutos.
11. Aspirar sobrenadante.
12. Añadir fijador: 500 µl de paraformaldehído al 1% en PBS, 0.1% de azida de sodio.
13. Analizar en el citómetro de flujo, durante las siguientes 24 horas. Empleando el programa *CellQuest*.

NOTA: Recordar que se debe ajustar previamente el equipo, con el Software *FACSComp* empleando las perlas de calibración.

Adquisición en el citómetro de flujo.

Utilizando el programa de adquisición y análisis *CellQuest* se dibujarán las siguientes gráficas de análisis:

1. Se dibujará una ventana en función de la dispersión frontal de la luz (FSC) y de la dispersión lateral de la luz (SSC), para ubicar a la región de linfocitos (**Figura 1**).

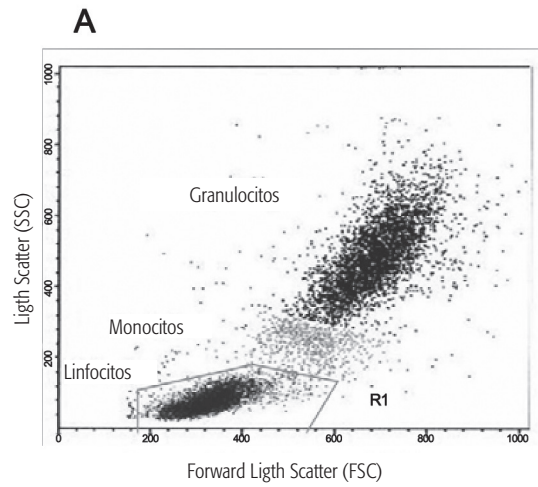


Figura 1. Selección de la región de análisis (linfocitos) en función de FSC y SSC.

2. Se dibujará una ventana para control negativo (**Figura 2**).

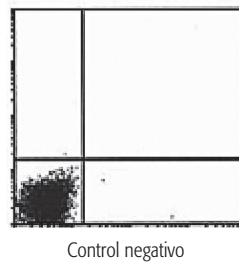


Figura 2. Gráfica de puntos en la que se muestran la calibración con el control negativo.

3. Se dibujará una ventana para ubicar a los linfocitos T4 y T8, así como los dobles positivos (**Figura 3**).

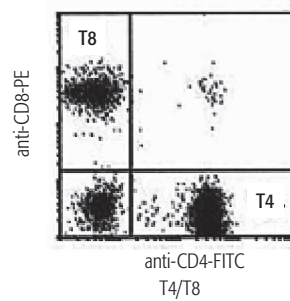


Figura 3. Gráfica de puntos en la que se muestran las subpoblaciones de linfocitos T4 y T8.

4. Se dibujará una ventana para ubicar a los linfocitos T3 y T4 (**Figura 4**).

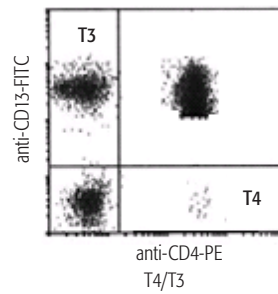


Figura 4. Gráfica de puntos en la que se muestran las subpoblaciones de linfocitos T4 y T3.

5. Se dibujará una ventana para ubicar a los linfocitos T y NK (Figura 5).

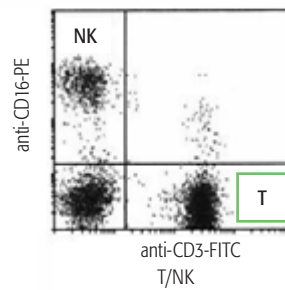


Figura 5. Gráfica de puntos en la que se muestran las subpoblaciones de linfocitos T y NK.

6. Se dibujará una ventana para ubicar a los linfocitos T y B (Figura 6).

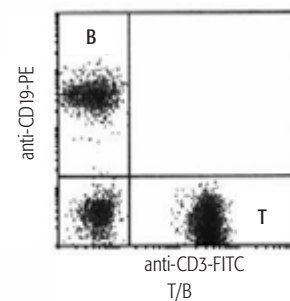


Figura 6. Gráfica de puntos en la que se muestran las subpoblaciones de linfocitos T y NK.

Optimización del equipo

7. Con el tubo del control negativo, ajustar el voltaje del SSC y la ganancia de amplificación en el FSC para observar a los leucocitos como la gráfica 1.
8. Ajustar los voltajes de los PMT con el tubo del control negativo, para que se observe en el cuadrante inferior izquierdo.
9. Compensar al citómetro con el tubo de la muestra marcada con CD3-FITC/CD19-PE.
10. Adquirir las muestras una vez terminada la compensación (Vea la práctica 1).

Análisis de resultados

De acuerdo a los datos obtenidos, exprese las siguientes relaciones:

I. Porcentaje de leucocitos

a) El porcentaje de linfocitos totales fue de _____

b) El porcentaje de monocitos fue de _____

c) El porcentaje de granulocitos fue de _____

II. Porcentaje de linfocitos T totales

a) CD3 / CD4 el % de linfocitos T totales fue de _____

b) CD3 / CD16+56 el % de linfocitos T totales fue de _____

c) CD3 / CD19 el % linfocitos T totales fue de _____

El porcentaje de linfocitos T totales es el promedio de estos tres tubos, de acuerdo con sus resultados este es de: _____

Una variación mayor al 10% entre ellos indica algún problema en su caso cual fue la variación _____ .

Con relación a lo anterior ¿son consistentes sus datos? _____ .

III. Porcentaje de linfocitos T4

a) En el tubo CD4 / CD8 el % de linfocitos T4 fue de _____

b) En el tubo CD3 / CD4 el % de linfocitos T4 fue de _____

c) ¿Son similares los % obtenidos entre ambos tubos? _____

d) Sí no, ¿cuál podría ser la causa? _____ .

IV. Porcentaje de linfocitos T, B y NK

a) El % total de linfocitos T fue de: _____

b) El % total de linfocitos B fue de: _____

c) El % total de linfocitos NK fue de: _____

d) La suma de estos tres es: _____

e) ¿Cuánto creen que deberían sumar? _____

V. Compare los resultados obtenidos con los valores de referencia mostrados en el **Cuadro 2** y en caso de no coincidir, explique cuál podría ser la causa. Estos valores fueron obtenidos en el laboratorio de Biología Celular y citometría de flujo de la UAM-Iztapalapa . (Ortiz y col., 1999).

Subpoblación celular	Promedio \pm desviación estándar	Intervalo
Linfocitos	26.6 \pm 4.2	20.1-39.5
Granulocitos	61.4 \pm 6.7	44.4-70.7
Monocitos	5.6 \pm 1.9	3.0-10.9
Subpoblación celular	Promedio	
	Mujeres	Hombres
Linfocitos T	68.5	65.4
Linfocitos B	12.9	13.7
Linfocitos NK	17.1	17.6
CD4 ⁺	38.6	37.1
CD8 ⁺	33.1	31.6
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	1.2	1.2

Cuadro 2. Intervalos de referencia para las subpoblaciones de linfocitos en jóvenes mexicanos sanos (Ortiz y col., 1999).

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

Cuestionario

1. Defina qué es el inmunofenotipo.
2. Explique cuál es el fundamento de la inmunotipificación de subpoblaciones celulares por citometría de flujo.
3. Explique cuál es la ventaja de utilizar mezclas de anticuerpos conjugados con fluorocromos en el análisis del inmunofenotipo.
4. Anote cuál es el CD de cada una de las subpoblaciones de linfocitos analizados en esta práctica.
5. ¿Qué significado biológico tiene analizar los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos en humanos?
6. Investigue un caso clínico en el que este método de análisis sea utilizado.

Bibliografía

- Ortiz R., Cortés E., Pérez L., González C., Rodríguez E., Betancourt M. 1999. Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Anim Exp*, 4: 33-39.
- Ortiz R., Cortés L., González C., Cortés E., Betancourt M. 1999. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: Estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica*. 24:18-22.
- Saavedra-Herrera M.V., Leyva Vázquez M.A., Illades-Aguir B., Armenta Solís A., López-Silva S., Rivera A.B., Terán-Poncayo M.A., Figueroa-Carbajal. 2008. Caracterización inmunofenotípica de leucemia aguda en niños en centros hospitalarios de Guerrero y Morelos. *Rex Mex Patol Clin*. 55: S5-S30.
- Sánchez S. 2007. Caracterización inmunofenotípica de la leucemia linfocítica crónica-B. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. Versión electrónica: scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02892007000200004. 10/agosto/2012.
- Ruiz-Argüelles A., Pérez Romano B. 2010. La necesidad de las recomendaciones de consenso para la inmunotipificación de la hematopatías malignas. *Rev Hematol Mex*. 11(2):82-90.

Práctica 7

Método alternativo para el análisis del contenido de ADN

Introducción

El análisis de las diferentes fases del ciclo resulta importante para diferentes campos de la biología y medicina. Para lograr este fin se han implementado diferentes técnicas citogenéticas y citofluorométricas. En el caso de la citometría de flujo, la cuantificación del contenido del ADN en la células ha permitido identificar en qué estado del ciclo celular se encuentran, lográndose por esta método un análisis en mucho menos tiempo que con otras técnicas.

El análisis del contenido del ADN se basa en el principio de que los colorantes específicos para esta molécula deben teñirla de una manera estequiométrica. Es decir, la cantidad de fluorescencia detectada en la célula analizada, es directamente proporcional a la cantidad de ADN, y por lo tanto se puede usar esta información para determinar la fase del ciclo celular. Existen diversas moléculas intercalantes de los ácidos nucleicos que cumplen con este requisito, teniendo ventajas unos sobre otros.

En las últimas décadas se ha descrito una gran cantidad de técnicas para medir el contenido de ADN, en las que se toma en cuenta la fuente celular (células animales, vegetales, etc), las condiciones en las que se encuentra, así como el tipo de intercalante más conveniente, según las especificaciones del citómetro o las necesidades del ensayo.

Además del análisis del contenido de ADN, es posible evaluar de forma rápida y eficiente diferentes aspectos relacionados con el ciclo celular como: duplicación del ADN, análisis de ploidías, estudio de proteínas asociadas con la proliferación, detección de ciclinas y de otros componentes relacionados con la regulación del ciclo celular.

Objetivo

Cuantificar células en diferentes fases del ciclo celular, utilizando citometría de flujo.

Objetivos particulares

Calibración del citómetro de flujo con núcleos de eritrocitos de pollo y de timo de ternera.

Analizar el ciclo celular de una muestra biológica con un método alternativo.

Material requerido

1 micropipeta de 1000 μ l

1 pipeta graduada de 5 ml

1 propipeta

1 pipeta Pasteur

1 vaso de precipitado de 50 ml

1 vaso de precipitado de 100 ml

6 tubos de poliestireno de 5 ml

1 gradilla

1 Agitador (vórtex)

Microesferas Calibrite 3 colores.

Partículas *DNA QC*

Solución envolvente comercial ó solución amortiguadora de fosfatos (3 litros aproximadamente)

Material Biológico:

Células en suspensión proporcionada por el profesor.

Soluciones preparadas previamente:

Alcohol al 70% con agua destilada. Colocar 5 ml en un tubo de vidrio y guardar en el congelador.

RNAse 1mg/ml, diluido en PBS. Guardar a -70°C hasta su uso. Si no es posible a esta temperatura, se puede guardar a -20°C temporalmente.

Yoduro de propidio (IP), 50 $\mu\text{g/ml}$ diluido en PBS. Guardar en refrigeración hasta su uso.

NOTA DE SEGURIDAD: El IP es una sustancia potencialmente mutágena y cancerígena, por lo que todos los sobrantes de las muestras y las partículas CEN y CTN, se colectan en un recipiente de plástico para eliminarlo por medio del programa “Laboratorio Seguro” de la UAM-Iztapalapa. También se colectan los tubos de plástico, las puntas de micropipetas y guantes que hayan estado en contacto con soluciones de IP.

Método o desarrollo

A. Preparación de la muestra:

Es factible obtener una muestra de núcleos de diferentes fuentes:

- Suspensiones celulares como: sangre periférica, líneas celulares, médula ósea.
- Tejidos sólidos, tumores sólidos, aspirados con aguja fina.
- Tejido en parafina: cortes de bloques

Es importante mencionar que las células deben estar en suspensión celular, para ello las muestras de tejidos sólidos se disgregan previamente, en general empleando enzimas como la pepsina.

A. 1

A continuación se describen los pasos necesarios de preparación de las células:

1. Las células deben obtenerse en suspensión. Se pueden probar diferentes métodos para disgregación. El uso de enzimas para separarlas puede ser efectivo o hacerlo mecánicamente haciendo cortes con bisturí. Otro método es la aspiración con agujas de 25×1.5 : se introduce la aguja en el tejido y se hace vacío para que las células sean capturadas, se debe cuidar que se queden en la aguja y cuando ya se atrapan, se vacían en 1 ml de PBS. Se deben hacer pruebas para ver cuál es el método más adecuado. Si la muestra es de sangre, haga los pasos de la sección A.2, antes de continuar con el paso 2 de este segmento.
2. Si ya se tienen las células en suspensión en PBS, centrifugar a 500 xg por 5 min.
3. Añadir 2 ml de PBS.
4. Centrifugar a 500 xg y retirar el sobrenadante.
5. Añadir 200 μl de PBS.
6. Se debe gotear la muestra en el tubo con el alcohol frío al 70%, en constante agitación (usando vórtex).
7. Dejar en reposo por 10 min a 4°C . Si es necesario, se puede guardar la muestra en congelación a -20°C . Se conserva por más tiempo a -70°C .

8. Centrifugar a 500 xg por 10 min a 10°C y retirar el sobrenadante.
9. Resuspender el paquete celular en 1.5 ml de PBS.
10. Centrifugar a 500 xg por 5 min. Retirar sobrenadante.
11. Añadir 500 µl de PBS.
12. Incubar 30 min a 37°C con 50µl de RNAsa (1mg/ml).
13. Después de la incubación con RNAsa, si hay aglomerados de restos celulares, se recomienda filtrar con una malla de nylon.
14. Añadir 250 µl fijador de paraformaldehído al 1% en PBS.
15. Añadir IP para una concentración final de 5µg/ml.

A.2.

1. Obtener 1 ml de sangre con ayuda de una jeringa heparinizada. Vaciar en un tubo de 5 ml.
2. Tomar 200 µl y colocar en un tubo de 5ml.
3. Añadir a la sangre 4 ml de solución de lisis en agitación.
4. Dejar reposar 10 min.
5. Centrifugar a 500 xg por 5 min.
6. Quitar el sobrenadante. Si el botón se ve rojo aún, repetir desde el paso 2.
7. Si el botón celular se ve blanco o con muy poco color rojo, añadir 2 ml de PBS. (Solo se recomienda lisar dos veces, si es necesario).
8. Centrifugar a 500 xg y retirar el sobrenadante.
9. Añadir 1 ml de PBS y resuspender.
10. Realizar el conteo de la concentración celular con un hematocitómetro y solución de Turk. La concentración necesaria es de 0.5×10^6 células/ml a 1.0×10^6 células/ml
11. Si es necesario, tomar otro 200 µl de sangre y repetir los pasos del 3 al 10 y juntar las dos muestras.

B. Calibración del equipo.

Para la calibración del equipo se emplearán las partículas "DNA QC"

- A: Suspensión de CEN en amortiguador y etanol
- B: Suspensión de CTN en amortiguador con formaldehído y timerosal al 0.01%.
- C: Perlas fluorescentes de 2 µm en amortiguador con gelatina y azida de sodio al 0.1%.
- D: Yoduro de propidio en amortiguador, concentración 50 µg/ ml.

Partículas CEN: Son núcleos fijados de eritrocitos de pollo que se usan como control de calidad para el aparato. Están preparados como núcleos simples, dobles, triples y algunos agregados mayores. Son útiles para probar la discriminación lineal y la resolución del aparato.

Método de preparación:

1. Agitar suavemente con un vórtex.
2. Poner en un tubo 1ml de IP (concentración: 50 (µg/ml).
3. Agregar una gota de las partículas al tubo (40 µl).
4. Tapar y agitar suavemente en un vórtex.
5. Incubar por 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente.
6. Guardar en oscuridad y a temperatura de 2 a 8° C, hasta su uso (son estables durante 4 horas)
7. Ajustar el equipo con estas partículas y adquirir en velocidad *LOW* en el programa *CellQuest* y la hoja de adquisición *DNA Experiment* del folder *DNA QC*.
 - a. Asegurarse de colocar el pico de las partículas simples en el canal 200 ± 5 en el parámetro FL2-A y FL2-W, ajustando con los controles de voltaje PMT de FL2 y el porcentaje de la ganancia de la amplificación FL2-W en el menú "*Detectors/Amps*".
 - b. Anotar los datos del canal promedio para marca uno (M1) y para la marca 2 (M2), del cuadro de estadística del histograma FL-2A.

Partículas CTN: Son núcleos aislados de timocitos de ternera, los cuales están en las diferentes fases del ciclo celular. Permiten detectar la discriminación precisa de dobletes. Se emplean también para determinar la adecuada detección de las células en las diferentes fases del ciclo celular.

Método de preparación:

1. Agitar vigorosamente en un vórtex
2. Poner en un tubo 1ml de IP (concentración: 50 (µg/ ml)
3. Agregar una gota de las partículas al tubo (40 µl).
4. Tapar y agitar suavemente en un vórtex
5. Incubar por 10 min en oscuridad y a temperatura de 2 a 8° C, hasta su uso (son estables durante 4 horas).
6. Adquirir y guardar los datos de estas partículas.

C. Optimización y adquisición de datos de ADN en el citómetro.

1. Optimizar el instrumento para la muestra con ayuda del programa *CellQuest* y el documento *PBMC Experiment* del folder *DNA QC*.
2. Si es necesario, en modalidad "*Setup*", ajustar a la población G1 en el canal 200 ± 5 en el parámetro FL2-A y FL2-W, de manera similar que con las partículas CEN.

3. Agitar suavemente antes de adquirir.
4. Modificar la adquisición para guardar 20 000 eventos, iniciar la adquisición y guardar.

Resultados

En la hoja de adquisición *DNA Experiment Document*, llame el archivo de las partículas CEN en el histograma FL2-A y calcule la linealidad. Se obtiene el canal promedio para marca uno (M1) y para la marca 2 (M2), del cuadro de estadística y se hace la siguiente relación:

$$\text{Mean M2/ Mean M1} = \text{linealidad}$$

El resultado debe ser entre 1.95 a 2.05.

Obtenga el CV de M1 en el cuadro de estadística del histograma FL2-A, el cual debe ser menor a 3.00 %. Tanto la linealidad como el CV son datos importantes para el seguimiento del funcionamiento del citómetro.

En cuanto a las partículas CTN y la muestra, se analizan en el programa ModFit LTTM. Obtenga las proporciones de las células en cada una de las fases del ciclo.

Análisis de resultados

Haga un análisis de los resultados obtenidos. Explique qué importancia tiene la linealidad y el CV de las partículas CEN.

Analice los porcentajes de células en cada fase del ciclo de las partículas CTN y observe si coincide con los datos del fabricante. Explique la importancia de estas partículas en el funcionamiento del citómetro.

De la muestra de células, observe el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo y analice si corresponde al tipo de celular, es decir, si es una población celular con alta proliferación o baja. Así mismo, diga qué se observaría en una población en diferentes condiciones: en un organismo en crecimiento, en cáncer, etc.

Conclusiones

Redacte las conclusiones con base en el cumplimiento de los objetivos.

Cuestionario

1. Investigue qué otros métodos, diferentes de la citometría de flujo, existen para cuantificar ADN.
2. Explique la ventaja de utilizar colorantes intercalantes en la determinación del contenido de ADN por citometría de flujo.
3. Investigue la importancia de la linealidad y su significado biológico.
4. Enumere las ventajas y desventajas del método utilizado en la a práctica 4 en relación al método utilizado en la presente práctica.
5. ¿Cuáles son otras aplicaciones que se pueden hacer de la cuantificación del contenido de ADN? Mencione alguna.

Bibliografía

- Becton Dickinson. 1999. Operator Training Manual (BDIS). San José CA. EUA.
- Darzynkiewicz Z., Juan G. y Bedner E. 1999. Determining cell cycle stages by flow cytometry. En: Current Protocols in Cell Biology: 8.4.1-8.4.18pp.
- Gallardo-Pérez J.C. y Rodríguez-Enríquez S. 2007. Problema bioquímico. Revista de Educación Bioquímica (REB), 26(2): 73-74.
- Ortiz R., Rodríguez L., Cortés L., Nájera O., Rodríguez E. y Cortés E. 2006. Estudios con citometría de flujo. Inmunofenotipo, proliferación, diferenciación, muerte celular y análisis de ADN. En: Tópicos de Genética. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 345-366 pp.
- Ormerod M.G. 2008. Flow Cytometry: A Basic Introduction. De Novo, EUA. 116pp. (<http://flowbook.denovosoftware.com/>)

Abreviaturas

7-AAD: 7-amino actimicina D

ADC: Siglas de las palabras en inglés "analog-to-digital converter".

ADN: Ácido desoxirribonucleico. DNA.

APC: Alofococianina.

AO: "*Acridin orange*", naranja de acridina.

ARN: Ácido ribonucleico.

BrdU: 5-Bromo-desoxiuridina.

BD: Nombre actual de la empresa Becton Dickinson.

BrEt: Bromuro de etidio.

CD: "*Cluster of differentiation*". Siglas adoptadas internacionalmente para grupo de diferenciación.

CEN: Núcleos de eritrocitos de pollo.

CF o CMF: Citometría de flujo.

CRETI: Acrónimo de la clasificación para identificar los residuos peligrosos y que significa: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico ambiental e inflamable.

CRETIB: Acrónimo de clasificación de las características a identificar en los residuos peligrosos y que significa: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico ambiental, inflamable y biológico-infeccioso.

Cy: *Cy-chrome*, en inglés. Marca registrada de cianina de ficoeritrina.

CV: Coeficiente de variación.

CTN: Núcleos de timocitos de ternera.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DCFH: 2',7'-dihidroclorofluoresceína.

DNA QCMR: Producto comercial que contiene núcleos de eritrocitos de pollo y núcleos de timocitos de ternera.

dUTP: Trifosfato de desoxiuridina.

FACS: *Fluorescence activated cytometry sorting*. Clasificador de células activadas por fluorescencia. Marca registrada por BD, pero utilizada comúnmente.

FCS: De las palabras en inglés "*flow cytometry standar*". Se podría traducir como citometría de flujo normalizado. Denominación para el tipo de archivo con datos de muestras obtenidas por citometría.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FL: Fluorescencia.

FSC: Ver dispersión frontal. Las siglas se derivan de las palabras en inglés "*forward scattering*".

IP: Yoduro de propidio.

LED: Diodo emisor de luz.

LSC: Citometría láser de barrido, "*láser scanning cytometry*".

NA: Número de apertura.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PE: Ficoeritrina.

PE-TR: Ficoeritrina-Rojo Texas

PerCP: Proteína de peridín clorofila o proteína de clorofila peridina.

PMT: Tubo fotomultiplicador.

RPBI: Residuos peligrosos biológico-infecciosos.

SIP: por sus siglas en inglés de "sample injection port", puerto de inyección de la muestra.

SSC: Ver dispersión lateral. Las siglas se derivan de las palabras en inglés "side scattering".

Tdt: Transferasa de desoxinucleotidil terminal.

TUNEL: "*Tdt-mediatef dUTP nick end labelling*". Marcaje por unión de dUTP mediado por Tdt.

UV: Ultravioleta.

Vocabulario

Adquisición: "Acquisition". Es el proceso para detectar y coleccionar las señales de una célula por medio de citometría y convertirlas en un archivo para analizar en un programa de computadora.

Amplificación: Proceso que incrementa la señal.

Anticuerpo: Proteína que secretan los linfocitos B ante la presencia de un antígeno, que además es capaz de unirse específicamente a este.

Aneuploidía: En citogenética, número anormal de cromosomas en una célula. En citometría, contenido de ADN anormal en una célula.

Antígeno: Molécula que las células del sistema inmunológico reconocen como extraña.

Autofluorescencia: capacidad de las células o partículas para absorber energía luminosa y liberarla en forma de fluorescencia.

Calibración: Procedimiento para realizar el seguimiento diario del funcionamiento del citómetro.

Canal: Se refiere al número contenido en la escala de un histograma.

Citometría de flujo: Tecnología que permite la medición simultánea de múltiples características de las células, mientras éstas están en suspensión en un fluido.

Citometría multiparamétrica: Se realizan mediciones simultáneas de un número de diferentes sustancias en las células.

Compensación: Proceso por el cual se elimina la sobreposición de los fluorocromos y, de esta manera, evitar que un detector capte la señal de un fluorocromo de una longitud de onda que no le corresponde.

Complejidad interna: Es una característica particular de cada célula que depende de la presencia de membranas internas y se mide por la desviación lateral de la luz al incidir sobre dichas membranas.

Convertidor de señal analógica a digital: ADC, dispositivo que convierte la señal de volts a un número de canal.

Dispersión frontal: Desviación de luz frontal o de ángulo pequeño que resulta de la desviación producida por la membrana celular o la superficie de la partícula.

Dispersión lateral: Desviación de luz lateral, ortogonal, 90° o de ángulo amplio.

Evento: Células o partículas que se analizan por citometría de flujo.

Filtro dicroico o espejo dicroico: Filtro de interferencia óptica que refleja la luz en una longitud de onda y transmite en otra.

Fotoblanqueamiento: Fenómeno que resulta de la pérdida de fluorescencia de una molécula, cuando la luz rompe un doble enlace.

Fotodiodo: Detector que capta luz y la convierte en una corriente de electrones. Es menos sensible que un fotomultiplicador.

Fluorescencia: Energía luminosa que libera una molécula, casi inmediatamente después de absorberla en una longitud menor a la que libera.

Fluorocromo: Molécula capaz de absorber energía luminosa y devolverla en una longitud de onda mayor, casi inmediatamente. Parte de la energía se libera como calor.

"Gate": Se puede interpretar como ventana. Se define por la selección de células en una región en una gráfica. Solo las células que están en esa región continúan hacia el siguiente paso de análisis. También es la selección de células deseadas para separación.

Marcaje: Se refiere a la utilización de reactivos o anticuerpos para revelar alguna característica de la célula.

Parámetro: Característica física o química de una célula.

Punto de interrogación: Es el punto donde coinciden la muestra en el flujo con el láser enfocado.

Optimización: Ajuste del citómetro para realizar una lectura adecuada de la muestra.

Tubo fotomultiplicador: Detector que capta luz y la convierte en una corriente de electrones. Es más sensible que un fotodiodo.

Separación de células: "Cell sorting". Es el proceso de separación física de partículas con base en la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por citometría de flujo.

Separación por deflexión electrostática: Consiste en la generación de gotas cargadas con la célula seleccionada y dirigirla a los tubos para recuperación.

Separación por sistema mecánico o hidráulico: Se hace uso de un tubo de captura colocado sobre la celda. Cuando se selecciona una célula, el tubo se activa y se coloca sobre la corriente de la muestra, para desviar a la célula a los tubos de recuperación.

Bibliografía complementaria

- Baumgarth N. y Roederer M. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunology Methods*, 243: 77-97.
- Bernas T., Grégori G., Asem E.K. y Robinson P. 2006. Integrating cytomics and proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5: 2-13.
- Bono MR, Simon V. Citometría de flujo: Principios básicos y aplicaciones. En *Fundamentos de Inmunología*. Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. Ed. Universidad de Talca 1998; 647-65.
- Brown M. y Wittwer C. 2000. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 46:1221-1229
- Chapman MR y Sohn LL. 2011. Label-free resistive-pulse cytometry. *Methods Cell Biol.* 102:127-57.
- Darzynkiewicz Z., Crissman H. y Jacobberger JW. 2004. Cytometry of the Cell Cycle: Cycling Through History. *Cytometry Part A* 58A:21-32
- Givan AL .2001. *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley, New York, EUA. 296 pp
- Hawley T.S. y Hawley R.G. 2004. *Flow cytometry protocols*. 2ª ed. Humana Press, New Jersey, EUA. 434 pp.
- Herrera G., Díaz L., Martínez-Romero A., Gomes A, Villamón E. Callaghan R.C. y O'Connor J.E. 2007. Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cells research. *Toxicology In Vitro*, 21: 176-182.
- Herzenberg L.A., De Rosa S.C. y Herzenberg L.A. 2000. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol. Today*, 21: 383-390.
- Janossy G. 2004. Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A*, 58: 87-97.
- Nunez R. 2001. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Current Issues Molecular Biology*, 3: 39-45.
- Ortiz R., Cortés C. Rodríguez E, y Cortés E. 1998. Aplicaciones de la citometría de flujo. *Boletín Mendel*, 7: 4-5.
- Perfetto S., Chattopadhyay P.K. y Roederer M. 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews in Immunology*, 4: 648-655.
- Reisberg M., Kasper C., Scheper T. 2001. Flow Cytometry in Biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 350-360.
- Shapiro H.M. 2004. Evolution of cytometers. *Cytometry Part A*, 58A: 13-20.
- Smith P.J., Khan I.A. y Errington R.J. 2005. Cytomics and cellular informatics –coping with asymmetry and heterogeneity in biological systems. *Drug Discovery Today*, 14: 271-277.
- Tung T.W., Parks D.R., Moore W.A., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical Immunology*, 110: 277-283.
- Valet G. 2005. Cytomics: an entry to biomedical cell systems biology. *Cytometry A*, 63: 67-68.
- Wood J.C.S. 2009. Establishing and maintaining system linearity En: *Current Protocols in Cytometry*. Wiley-Liss Publication, New York, EUA. 1.:4 1.4.1-1.4.12.
- Wulff S. 2006. *Flow cytometry. Educational guide*. 2a ed. editado por Dako, California, EUA. 120 pp.

Páginas electrónicas recomendadas

Las siguientes páginas fueron verificadas el 31 de agosto de 2012.

Citometría de flujo: www.citometriadeflujo.com/

TSRI Flow Cytometry Core Facility: <http://facs.scripps.edu/facsindex.html>

BD Biosciences. Multicolor Flow Cytometry: <http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/tools/index.jsp#usage>

Ormerod M.G. Flow Cytometry: A Basic Introduction:

<http://flowbook.denovosoftware.com/>

Purdue University Cytometry Laboratories: <http://www.cyto.purdue.edu/>

Verity Software House: <http://www.vsh.com>

Visualizadores de espectros:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

<http://www.mcb.arizona.edu/ipc/fret/index.html>

http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp

Cursos interactivos de citometría de flujo y videos:

http://www.bdbiosciences.com/support/training/self_paced.jsp

http://www.bdbiosciences.com/support/training/itf_launch.jsp

<http://www.coulterflow.com/bciflow/theory.php>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

http://www.abdserotec.com/support/introduction_to_flow_cytometry-685.html

Manual de prácticas de laboratorio. Citometría de Flujo
Se terminó de imprimir en enero de 2014,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600