



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Proyecto de Innovación

Convocatoria 2020/2021

Nº de proyecto: 243

eFACS: una plataforma para la realización de practicas de laboratorio virtuales de citometría
de flujo

Pedro Antonio Reche Gallardo

Facultad de Medicina

Departamento de Inmunología, Oftalmología y Otorrinolaringología

1. Objetivos propuestos en la presentación del proyecto

La pandemia originada por el COVID-19 dio lugar a una situación sin precedentes en nuestra universidad: aulas cerradas y la obligación de continuar las actividades presenciales de forma online. La docencia teórica se transformó en docencia virtual, apoyada por un amplio surtido de plataformas y herramientas disponibles online. Por el contrario, la docencia práctica desarrollada esencialmente en laboratorios, quedó en gran medida sin impartir debido a la gran carencia de recursos informáticos específicos que permitan una actividad práctica virtual. En este contexto surgió este proyecto de innovación docente con los siguientes objetivos:

1. Generar una herramienta informática que simule el funcionamiento de citómetro de flujo (eFacs)
2. Implementar la herramienta para su uso online
3. Generar material didáctico, incluyendo prácticas de laboratorio virtuales que ilustren el uso del citómetro de flujo en la investigación científica y el diagnóstico médico. También se preveía generar videos didácticos.
4. Incorporación de prácticas virtuales de laboratorio al programa de prácticas de la asignaturas de Inmunología de los grados en Medicina y Bioquímica y en la asignatura de Inmunotecnología del Máster en Investigación en Inmunología.

2. Objetivos alcanzados

El objetivo principal de este Proyecto era implementar una herramienta online que permita a los estudiantes el familiarizarse con el funcionamiento de un citómetro de flujo (eFACS) se ha alcanzado plenamente. Esta herramienta está disponible en el siguiente URL: <http://imbio.med.ucm.es/efacs/>

La herramienta simula de citómetro de flujo de tres colores y permite a los usuarios realizar diversas tareas predefinidas, empezando con las más básica y rutinaria consistente en familiarizarse con los detectores y obtener los parámetros de compensación de fluorescencia. El citómetro de flujo es una herramienta esencial para analizar y discriminar poblaciones celulares que han sido marcadas con anticuerpos fluorescentes. En estos momentos eFACS permite analizar tres tipos de muestras ("beads", sangre lisada y células obtenidas de sangre) con distintos anticuerpos fluorescentes (ANEXO I).

Además se ha generado material didáctico que explica las bases del funcionamiento del citómetro de flujo y su utilidad. Este material incluye un guión de prácticas para el análisis de las poblaciones celulares existentes en sangre usando eFACS (ANEXO II). Los alumnos de inmunología del grado de Medicina tienen en estos momentos una práctica en la que se aíslan células mononucleares de sangre

periférica mediante un gradiente de densidad y esta práctica les servirá para visualizar las poblaciones celulares presentes. Nuestro objetivo era incorporar esta práctica en el programa de prácticas del grado de Medicina durante curso 2020/2021 pero la herramienta no estuvo preparada a tiempo y confiamos hacerlo en el curso 2021/2022.

3. Metodología empleada en el proyecto

3.1. Programación de eFACS

Para la herramienta eFACS se han tomado las librerías de JavaScript (JS) generadas por Richard Weiss para simuladores de FACS disponibles bajo licencia GNU. Estas librerías dependen a su vez de las librerías de JS JQUERY y FD-SLIDER. JQUERY es una librería con distribución gratuita bajo la licencia permisiva MIT y se utiliza rutinariamente por más del 70% de las Webs para simplificar y manipular HTML (HyperText Markup Language). Por su parte FD-SLIDER es una librería desarrollada por Brian McAllister con licencias GPL y MIT.

3.2. Implementación Web de eFACS

La implementación web de eFACS se ha realizado mediante una combinación de lenguaje HTML (HyperText Markup Language) y CSS (Cascading Style Sheets), en un ordenador Linux Debian (Debian 4.9.168-1+deb9u2 (2019-05-13) x86_64 GNU/Linux) con Apache 2.0 como gestor Web.

3.3. Generación de material docente

El material docente incluyendo las guías de prácticas virtuales se han generado utilizando las aplicaciones incluidas en el paquete MS OFFICE. La información para preparar el material docente sobre el funcionamiento y aplicaciones de un citómetro de flujo se ha obtenido de la Web y de la literatura, confirmado previamente que no está sujeta a “copyrights” que impidan su uso.

4. Recursos humanos

Para la ejecución del proyecto se contó con un equipo multidisciplinar compuesto por 13 personas entre las que se encuentran 4 profesores de Inmunología, 1 de Bioquímica y 1 de Química Orgánica, todos ellos con amplia experiencia en innovación docente. El resto del equipo ha consistido en 6 estudiantes predoctorales. También hemos contado con un miembro del personal administrativo que ha coordinado los grupos de trabajo. Los miembros del equipo aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Miembros del Equipo

Nombre	Adscripción	Categoría ¹
Pedro Antonio Reche Gallardo	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	PTU
José Manuel Martín Villa	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	CU
M ^a Esther Lafuente Duarte	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	PTU
Oscar Palomares Gracia	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas	PTU
M ^a del Mar Martín-Fontecha Corrales	Unidad departamental de Química Orgánica, Facultad de Óptica	PTU
Carlos Cabañas Gutiérrez	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	PA
Silvia Aragón Pérez	Facultad de Medicina	PAS
Hector F. Peláez Prestel	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED*
Álvaro Torres Gómez	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED
José Luis Sánchez-Trincado	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED
Marta Gómez Perosanz	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED
Tara Fiyouzi Alipour	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED
Álvaro Ras Carmona	Facultad de Medicina, Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL	ED

¹ PTU, Profesor Titular de Universidad; CU, Catedrático de Universidad; PA, Profesor Asociado; PAS, Personal de Administración y Servicios; ED, Estudiante de Doctorado; * Empezó el proyecto como estudiante de grado.

5. Desarrollo de las actividades

5.1. Organización temporal de las actividades y personal involucrado

El desarrollo de las actividades propuestas en el proyecto sufrió un pequeño retraso y algunas modificaciones debido a que tardamos más de lo previsto en desarrollar e implementar la herramienta eFACS en línea. Teniendo en cuenta que el proyecto se ha

completado en finalmente en 14 meses las actividades se han desarrollado siguiendo el siguiente plan/cronograma.

1. Realización de 2 reuniones iniciales del grupo para establecer la ejecución del proyecto, intercambiando opiniones entre todos los componentes (Meses I-III).
2. Programación de la herramienta eFACS (Meses II-VI)
3. Implementación online de la herramienta eFACS (Meses VI-IX)
5. Testado y correcciones de la herramienta eFACS (Meses IX)
4. Realización de reunión para consensuar el material docente y su ubicación (Meses IX);
6. Preparación del Material Docente. Práctica de Laboratorio virtual (Meses IX-XIII).
7. Preparación y corrección de la memoria (Meses XIV).

Las tareas específicas realizadas por los miembros del grupo de trabajo aparecen reflejadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Tareas realizadas por los miembros del equipo

Tarea	Personal
Responsable	Pedro A. Reche (PAR)
Gestor	Silvia Aragón Pérez (SAP)
Programación	PAR y Álvaro Ras Carmona (ARC)
Diseño y Supervisión del material docente	Esther M. Lafuente (MEL), José M Martín-Villa (JMM); Carlos Cabañas Gutiérrez (CCG), Oscar Palomares Gracias (OPG), Mar Martín-Fontecha (MM-F) & PAR
Elaboración del guión de prácticas	Héctor F. Peláez Prestel (HFP), Marta Gómez Perosanz (MGP), José L. Sánchez-Trincado (JLS), Alvaro Torres Gómez (ATG) & Tara Fiyouzi Alipour (TFA), MEL & PAR
Testado eFACS y sugerencias mejora	HFP, MGP, JLS, ATG, TFA

5.2. Memoria Económica

La dotación del proyecto de innovación docente (750 Euros) se ha empleado como se indica en la Tabla 3.

	Año 2020	Año 2021
Material inventariable		

Ordenador	519 Euros	
Pantalla		134.2 Euros
Toner		68.97 Euros
Total Anualidad	519 Euros	203.17
TOTAL	722.17 euros	

5. 3. Conclusiones del Proyecto

En este proyecto hemos implementado un recurso online que permite simular el uso de un citómetro de Flujo de tres colores similar al FACScalibur. El citómetro de flujo es un instrumento esencial para la investigación básica y aplicada en biomedicina. Sin embargo, su uso requiere cierto entrenamiento y el análisis de muestras resulta costoso. Además, en universidades y hospitales no todos los departamentos disponen de un citómetro de flujo, usándose generalmente los disponibles en los centros de asistencia a la investigación. Como resultado los alumnos no tienen acceso a estos instrumentos y no tienen posibilidad de familiarizarse con las técnicas de citometría de flujo, recibiendo tan solo una información teórica sin llegar a saber hacer. En este contexto, la herramienta eFACS :

- Soluciona la falta de accesibilidad y disponibilidad de citómetro de flujo para uso del estudiante
- Posibilita la generación de material didáctico que permita al alumno planear y ejecutar un experimento de citometría de flujo y que aprendan haciendo.
- Posibilita el entrenamiento de los usuarios en un simulador antes de enfrentarse a un citómetro de flujo real.

El recurso eFACS es en conclusión un gran apoyo tanto para la docencia como para la investigación.

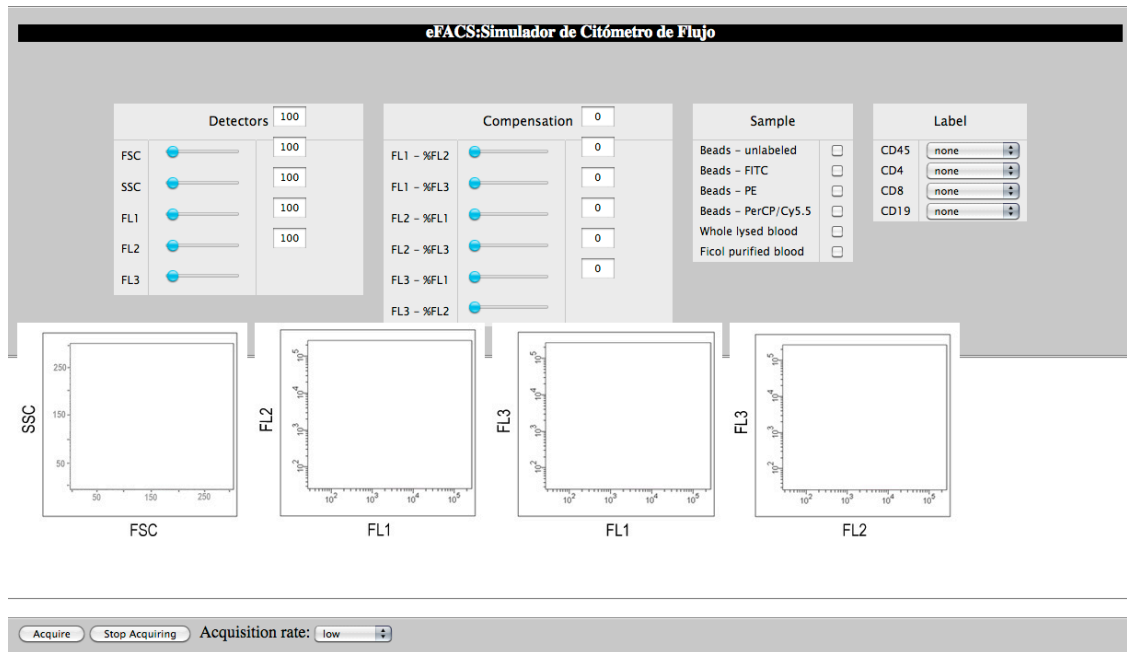
6. Anexos

Anexo I. Herramienta eFACS

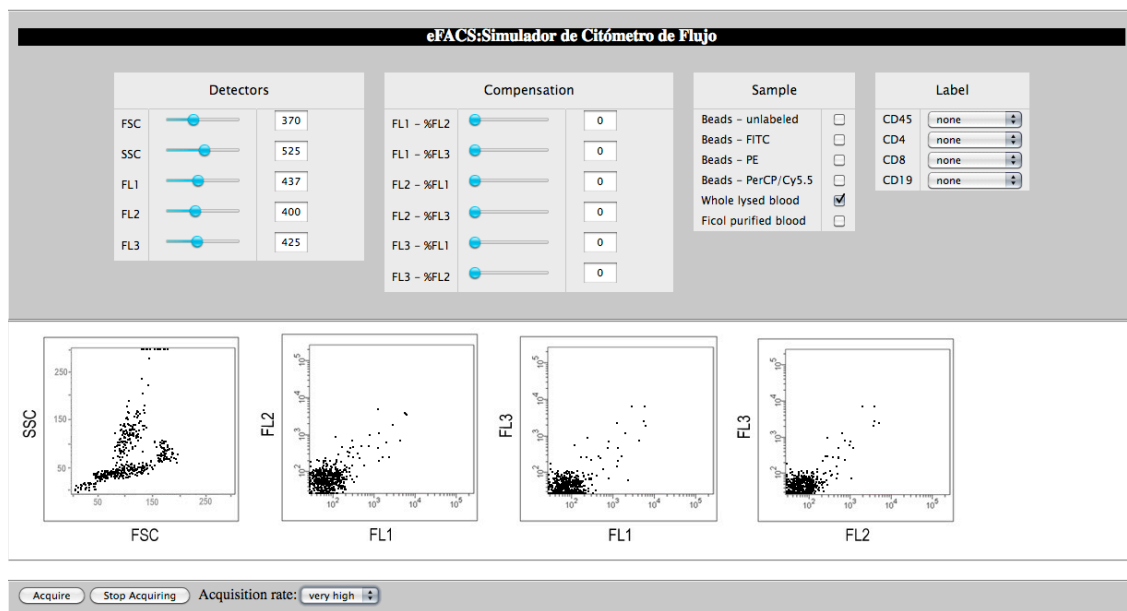
Anexo II. Práctica virtual: Fenotipado linfocitario usando eFACS

Anexo I. Herramienta eFACS

A



B



La herramienta eFACS está disponible en <http://imbio.med.ucm.es/efacs/>. A) Imagen muestra la página entrada de la herramienta B) Imagen correspondiente a un análisis de sangre completa lisada y sin marcaje fluorescente en la que los componentes celulares se han separado en virtud de la luz del láser que atraviesa la muestra sin desviarse (FSC) y la desviada lateralmente (SSC).

Anexo II. Práctica virtual: Fenotipado linfocitario usando eFACS

PRACTICA CON CITOMETRO DE FLUJO VIRTUAL: FENOTIPO LINFOCITARIO

I. Objetivo

- Realizar un estudio fenotípico de las distintas células del sistema inmune.
- Saber qué cantidad de células T, B tiene un paciente.
- Conocer si la proporción relativa de estas subpoblaciones se ajusta a unos límites de normalidad

II. Introducción

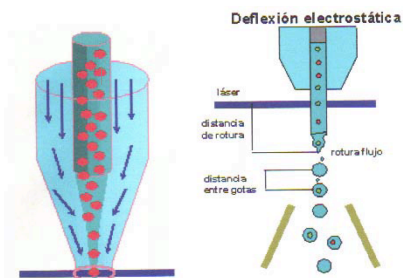
Llamamos fenotipo al conjunto de moléculas de superficie que posee un determinado tipo celular y que lo hace diferente del resto de tipos celulares. La técnica más utilizada, con diferencia, es la "citometría" (más exactamente la "citofluorometría de flujo").

Mediante la "citofluorometría de flujo", es posible determinar el número total de leucocitos, indicando el número y porcentaje de linfocitos, neutrófilos, monocitos y granulocitos. En segundo lugar, usando también la "citofluorometría", se puede analizar el número y porcentaje de células que expresan marcadores de superficie característicos de células T, B y NK. La determinación del fenotipo celular se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos monoclonales, marcados con distintos fluoróforos, los cuales se unen a moléculas específicas, de grupos de diferenciación (CD) en la superficie celular. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que detectan las moléculas CD19, CD3 y CD56, presentes en la superficie de los linfocitos B, T y NK respectivamente (Tabla I) se emplean para cuantificar dichas poblaciones celulares. Esta técnica se puede realizar tanto en sangre total (previa lisis de los eritrocitos existentes) como en linfocitos aislados de sangre periférica. Actualmente, existen varios métodos de estudio de subpoblaciones por "citofluorometría", dependiendo del número de anticuerpos monoclonales con distintos fluorocromos que utilicemos por muestra.

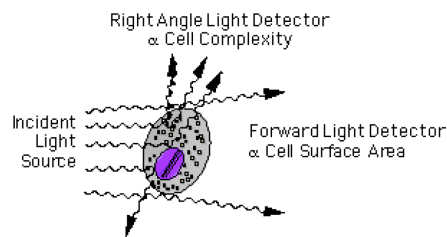
Tabla I. Marcadores de poblaciones celulares

ANTIGENO DE DIFERENCIACION	REACTIVIDAD
CD2	Pan- células T
CD3	Pan- células T
CD4	Linfocitos T cooperadores
CD8	Linfocitos T citotóxicos
CD19	Pan-células B
CD45	Pan-Leucocitos
CD14	monocitos
CD15	Neutrófilos
CD56	NK

La "citofluorometría" de flujo necesita de la utilización de un equipo informatizado relativamente complejo llamado citómetro (o citofluorímetro) de flujo. Como muestra el esquema de la izquierda, estos aparatos permiten el análisis rápido de la morfología de las células en medio líquido. Para ello, aísla las células en un flujo muy fino, de modo que sólo haya una célula por microgota. Un delgado rayo láser incide sobre las microgotas conteniendo las células.



En el siguiente esquema se muestra como el citómetro es capaz de reducir la luz de un tubo por el que pasa una gota que lleva como máximo una célula de la cual analizará las características que a continuación citamos
Partiendo de los datos de reflexión / refracción de dicho

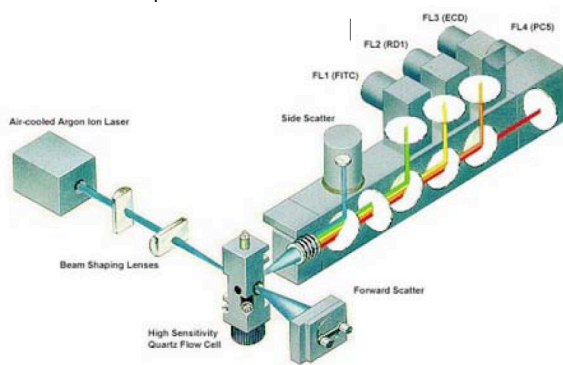


láser sobre las células, se puede hacer un estudio morfológico celular bastante completo. Pero además, se puede estudiar la fluorescencia emitida por las células (que dependerá de que se haya pegado a su superficie un anticuerpo monoclonal en estudio).

Los citómetros constan básicamente de un láser que emite luz a una determinada longitud de onda y poseen 3 tipos distintos de detectores:

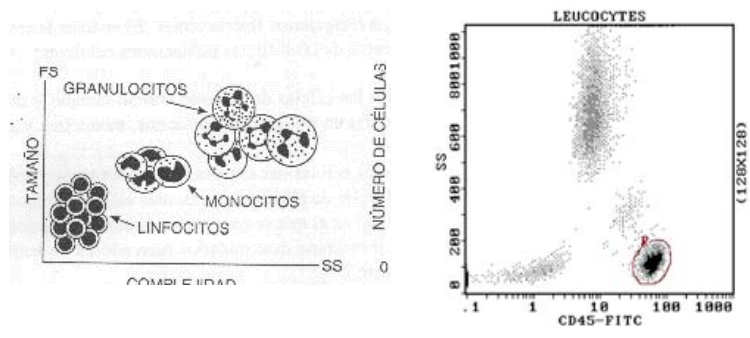
- Un detector para el tamaño celular (reflexión) o *scatter* frontal (FSC).
- Un detector para la morfología (complejidad) de la célula (refracción) o *scatter* lateral (SSC)
- Uno o más detectores que recogen emisiones fluorescentes a distintas longitudes de onda, los filtros Bandpass (FL).

En el siguiente esquema observamos el funcionamiento del citómetro: la suspensión celular se hace circular en forma de gotas microscópicas, las células pasan por un campo de detección atravesado por un potente rayo láser, se produce entonces la dispersión de la luz, relacionado con el tamaño (*scatter* frontal), la complejidad del citoplasma (*scatter* lateral) y la activación de la fluorescencia, cada una de estas tres características se recoge por sensores específicos lo que permite el análisis y cuantificación de las poblaciones. Así pues, las medidas que realiza este aparato son tanto de características físicas (tamaño, volumen, índice de refracción, viscosidad...) como químicas (contenido de DNA y RNA, proteínas y enzimas). Las moléculas de la superficie celular se detectan por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales marcados con sustancias fluorescentes. Nosotros utilizaremos como sustancias fluorescentes: FITC (verde), PE o ficoeritrina (amarillo-naranja) y PerCP (rojo).



Así pues, por ejemplo, si hacemos pasar por el citómetro una muestra de sangre completa obtendríamos la figura de la parte inferior izquierda, donde vemos un histograma en el que se representan los datos obtenidos en un diagrama: tamaño / complejidad. Esto permite discriminar entre granulocitos

(células de mayor tamaño y complejidad), monocitos (se sitúan en término medio) y linfocitos (células de menor tamaño y complejidad). Estos últimos por sus características podrían confundirse con los desechos celulares, que suelen ser abundantes en el manejo inadecuado del material. Como solución a este problema se pueden marcar las células empleando un anticuerpo anti-CD45 acoplado a FITC que se uniría a dicho antígeno presente en todos los linfocitos. Esto se muestra en la gráfica derecha, que representa la distribución celular según la complejidad celular y la fluorescencia obtenida al reaccionar el fluoróforo.



III. Material

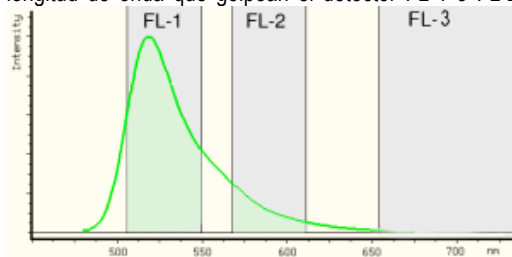
Acceder al siguiente recurso web:

<http://reche.med.ucm.es/efacs/>

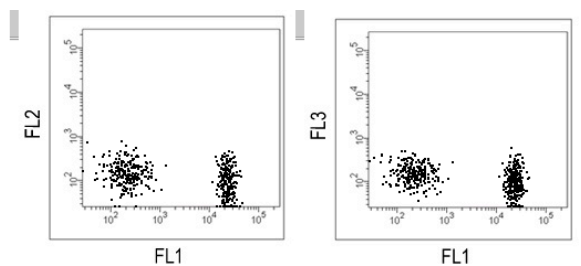
IV. Procedimiento

Seguir las tareas indicadas en la web

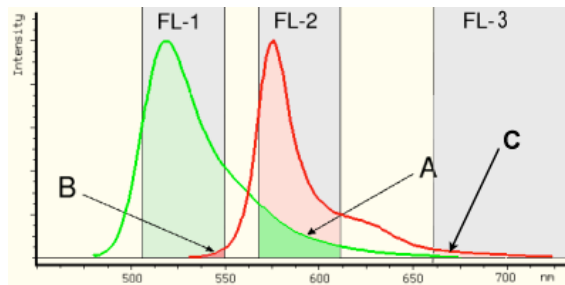
1. En primer lugar, familiarízate con los detectores. Coloca una muestra con partículas sin etiqueta (Beads - unlabeled) en el dispositivo, haz click en *acquire* y cambia el voltaje en los detectores. Observa cómo cambian las señales en las diferentes gráficas. ¿Qué significan FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3?
2. Ahora coloca la muestra de sangre entera lisada (whole lysed blood) en el dispositivo. Optimiza la configuración de FSC y SSC. ¿Cuántas poblaciones de células puedes reconocer? ¿Cuáles son?
3. Crea la configuración adecuada para medir tu muestra. Para hacer esto, comienza de nuevo con partículas sin marcar. Configura los detectores de fluorescencia (FL) de modo que la señal esté en el rango de hasta 10^3 aproximadamente (Voltaje de los detectores de menos de 500 aproximadamente). Esto es lo que consideraremos como "negativo"
4. Si los detectores están configurados correctamente, las señales deben compensarse en consecuencia. Para hacer esto, coloca las partículas marcadas con FITC en el dispositivo. Observa el gráfico de la derecha: La línea verde corresponde al espectro de emisión de FITC. Las áreas grises son las áreas de longitud de onda que golpean el detector FL-1 o FL-2 a través del filtro Bandpass correspondiente.



5. Ahora configura la compensación correcta de la señal FITC. Para hacer esto, debes restar del detector FL2 (y en menor medida del detector FL3) un cierto porcentaje de la señal que cae del detector FL1. Observa cómo cambia la población a medida que cambia la compensación. Debes tener obtener unos paneles similares a estos ¡Ya no debes cambiar la configuración de los detectores! Esta población será positiva para FITC.



6. Ahora coloca las partículas marcadas con PE en el dispositivo y compensa la señal PE. Como puede verse en el gráfico, la señal PE solo se irradia en muy pequeña medida al detector FL1 (B). Sin embargo, existe una fuerte superposición con el detector FL-3 (C). Compénsalo de la misma manera que en el apartado anterior, pero en este caso restando al detector FL-3 y FL-1 un cierto porcentaje del detector FL-2.



7. Ahora coloca las partículas marcadas con PerCp en el dispositivo. La exposición a los detectores FL1 y FL2 es mínima, por lo que la compensación generalmente no es necesaria. Una vez compensado el citómetro **NO CAMBIES NADA DE LA CONFIGURACIÓN.**

Ahora trabajaremos con la muestra sangre lisada. Para su preparación, brevemente:

1. Recoger sangre venosa humana, con anticoagulante (EDTA).
2. Preparar tubos limpios para el citómetro e identificarlos adecuadamente.
3. En cada tubo depositar 50 μ l de sangre.
4. Añadir los anticuerpos monoclonales.
5. Mezclar suavemente e incubar durante 15 minutos en oscuridad.
6. Añadir 1000 μ l de solución de lisis al tubo, que lizará los eritrocitos, para que no enturbien los resultados.
7. Mezclar suavemente y después ponerlo a incubar durante otros 15 minutos en la oscuridad.
8. Analizar las muestras en el citómetro.

Introduce la muestra de sangre completa (whole lysed blood) en el dispositivo. En el panel de control de la parte superior derecha puede teñir la muestra con diferentes anticuerpos con diferentes fluorocromos:

- CD45 - todos los leucocitos
- CD4 - células T helper
- CD8 - células T citotóxicas
- CD19 - células B

Citometría de Flujo, Fenotipado Leucocitario. Cuestionario para el alumno.

Apellidos:

Nombre:

Grupo de prácticas:

Grupo de teoría:

Fecha:

1. Lleva a cabo la tinción adecuada para determinar el número de células T helper con la mayor precisión posible. ¿Qué marcaje usarías?
2. Haz otra tinción con el fin de determinar el número de células T citotóxicas con la mayor precisión posible. ¿Qué marcaje usarías?
3. Realiza la tinción adecuada para determinar el ratio CD4/CD8, tan precisa como sea posible. ¿Qué marcaje usarías?
4. Lleva a cabo la tinción adecuada para determinar el ratio de células T/B tan precisa como sea posible. ¿Qué marcaje usarías?
5. Compara la muestra de sangre completa con la muestra purificada con Ficoll. ¿Cuáles son las diferencias?