



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Proyecto de Innovación

Convocatoria 2023/2024

Nº de proyecto:112

Aplicación de la citometría de flujo como herramienta para el
estudio de la Inmunología Molecular

Responsable del proyecto:

Aranzazu Cruz Adalia

Facultad de Medicina

Departamento: Inmunología, Oftalmología y ORL

INFORME

1. Objetivos propuestos en la presentación del proyecto

El propósito fundamental delineado en este proyecto fue la integración de una estrategia didáctica destinada a promover la participación activa de los estudiantes, induciendo un proceso de aprendizaje significativo. En este contexto, se planteó la resolución de casos prácticos mediante el ejercicio del razonamiento, seguido de su aplicación en el entorno experimental del laboratorio. Se privilegió el empleo de la citometría de flujo, una técnica ampliamente reconocida en el ámbito de la Inmunología.

Los problemas que resolvía como objetivo final eran:

- Los alumnos serían capaces de resolver cuestiones que pueden plantearse al estudiar la Inmunología Molecular de manera práctica y tangible, dando la posibilidad al alumno de convertirse en el protagonista de su propio aprendizaje.
- Aprendizaje colaborativo: el alumno aprenderá a trabajar y resolver cuestiones experimentales en equipo, lo cual es fundamental para trabajar en un laboratorio de Investigación.
- Proporcionará un enfoque práctico a los conocimientos adquiridos en la realización del Máster de Investigación en Inmunología (4312450), al cual se adhiere el presente Proyecto de Innovación Docente.

Necesidad a la que responde:

- Con este proyecto posibilitaríamos al alumnado el aprendizaje y uso de la citometría de flujo, una técnica utilizada ampliamente en Inmunología, y que no se enseña en otras asignaturas del Máster de Investigación en Inmunología. Con este proyecto cubrimos la necesidad de enseñar esta técnica tan esencial en el campo de la Inmunología.

2. Objetivos alcanzados

Siguiendo la relación del objetivo propuesto en la solicitud del proyecto y de acorde al programa planteado inicialmente, podemos considerar un alto grado de consecución de los objetivos propuestos.

Al inicio de curso 2023-24 se prepararon las prácticas de citometría de flujo para su realización en el Máster. Se realizó una encuesta al alumnado para saber el grado de conocimientos previos que tenían sobre citometría de flujo a nivel práctico en el laboratorio. En base a los resultados, se dividieron los alumnos en dos grupos, de iniciación y de conocimientos avanzados.

Se impartieron las actividades inicialmente propuestas teniendo lugar en las fechas indicadas en el programa académico, realizando las prácticas en una sesión de 4h por la mañana, dividiendo los alumnos en grupos de iniciación y avanzado.

Tras las sesiones se realizaron encuestas a los asistentes que se han usado para valorar el impacto de las actividades y el grado de satisfacción con las mismas (Anexo I). Según estas encuestas:

-El 100 % de los encuestados consideran que la temática abordada en las actividades las actividades han sido de su interés.

-Mas del 79% de los encuestados consideran que las actividades cubrieron sus expectativas, con un alto nivel de satisfacción, ya que el 67% de los encuestados valoraron la adecuación de las prácticas al contenido de la asignatura con la máxima nota (5 sobre 5) y un 12% con 4 sobre 5 (Anexo I), sin tener ninguna evaluación de mínima calificación (0, 1 o 2).

- Se valoró como excelente la claridad de las diapositivas y explicación con un 80% de los encuestados con la máxima nota (5 sobre 5) y un 20% con un 4 sobre 5 (Anexo I).

-La contribución del profesor en el buen funcionamiento de la práctica y si promueve el interés del alumno se valoró con una media de 4,8 sobre 5 tanto en el caso de la Dr. Aránzazu Cruz Adalia como en el caso del Dr. Ignacio Juárez Martín (Anexo I).

Hay que destacar que las encuestas de evaluación de los alumnos en este proyecto 23/24 han mejorado aún más las calificaciones con respecto al proyecto del curso pasado, con lo que concluimos que los cambios realizados en este proyecto han mejorado la docencia de esta práctica. Aun así, hay que considerar las sugerencias y comentarios del alumnado que nos parecieron de especial interés para la mejora de este programa entre las que destacamos las siguientes:

“Menos alumnos por grupo”

“Dejar más tiempo para el análisis de los datos con el Flowjo”

“Separar en más tiempo las prácticas de los exámenes, hacerla en noviembre en vez de en enero”

“Todo me gustó, práctica muy completa”

“La división en diferentes grupos de conocimiento ha sido un acierto”.

“Poner más sesiones de prácticas, se quedó corta”

“La atención y explicación individualizada de cómo interpretar los datos fue lo mejor”

“En el grupo de iniciación, dejar manipular más el citómetro con supervisión del profesor”

Dificultades y Limitaciones:

Los grupos se dividieron por conocimientos previos pero algunos alumnos piden que se reduzcan más aún los grupos, para que haya menos estudiantes por laboratorio. En el curso que viene, se intentará mejorar esta parte, implicando más profesores en la docencia (prácticas simultaneas en dos laboratorios), y poniendo varios días de prácticas para poder separar por grupos más pequeños.

Una limitación es que no tenemos licencia de software de análisis de citometría para que ellos puedan manejarlo y aprender. Al año que viene, pediremos que se lleven portátiles y que se instalen la demo para que, al menos, el día de la práctica puedan analizarlo ellos bajo supervisión del profesor.

3. Metodología empleada en el proyecto.

FASE 1: Organización de los alumnos: Se realizó una sesión por grupo de 4 h para desarrollar este proyecto. Se dividieron los alumnos del Máster en grupos de iniciación y de avanzado, según conocimientos previos.

FASE 2: Introducción, diseño y discusión del caso práctico

GRUPOS DE NIVEL “INICIACION EN CITOMETRIA DE FLUJO”: grupos con un conocimiento limitado de citometría de flujo

- Se realizó una explicación básica de la citometría de flujo, más extensa para este grupo de alumnos que no tenían conocimientos previos.
- Se realizó una simulación práctica de cómo compensar el citómetro con una herramienta informática diseñada por el Dr. Pedro Antonio Reche Gallardo
- Se expuso el caso práctico y se usaron herramientas informáticas para el diseño del panel de citometría de flujo usado en la práctica.
- Se realizó el caso práctico de laboratorio con linfocitos activados con PMA o sin estimular y se marcaron con anticuerpos fluorescentes que reconocían proteínas de membrana cuya expresión se alteraba de manera significativa (bien aumentando o bien disminuyendo) cuando un linfocito se activa. Se discutieron los resultados y los controles negativos y positivos que son fundamentales en la metodología científica, que obligatoriamente tienen que aprender en esta asignatura del Master en Investigación de Inmunología.
- Se analizaron las muestras por el citómetro de flujo, discutiendo a posteriori el resultado obtenido, utilizando el software Flowjo.

GRUPOS DE NIVEL “AVANZADO EN CITOMETRIA DE FLUJO”: grupos con alto conocimiento de citometría de flujo.

- Se realizó una introducción breve sobre la citometría de flujo, haciendo hincapié en las diferentes utilidades y en el tipo de citómetros que hay disponibles hoy en día para realizar análisis multiparamétricos.
- Se explicó cómo realizar un panel paramétrico, y los controles necesarios y fundamental para realizarlo correctamente en la práctica
- Se le proporcionó a cada grupo un tipo celular diferente en una placa de laboratorio y así tenían que averiguar qué tipo celular había sido asignado a cada grupo, y cómo podrían resolverlo usando citometría de flujo. Les facilitamos la información de los diferentes tipos celulares (linfocitos B, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T $\alpha\beta$, o PBMC) y ellos tuvieron que diseñar el panel de citometría multiparamétrico usando de 6 anticuerpos para resolver el caso. Tras la puesta en común del grupo, los alumnos aprendieron la combinación de anticuerpos más eficiente (previamente diseñada por el profesorado del Proyecto) para el análisis a realizar.
- Una vez decididos los anticuerpos que iban a usar para poder reconocer las diferentes células, tuvieron que discutir sobre qué fluorocromos serían los mejores para combinar en el citómetro de flujo. Para ello, les enseñamos a usar softwares gratuitos que hay disponibles en internet para saber cómo elegir dichos fluorocromos dependiendo de los receptores analizados y la configuración del citómetro.
- Los alumnos aprendieron a compensar de manera manual diferentes fluorocromos en el

citómetro por un software que ha programado el Profesor Pedro Antonio Reche Gallardo, pero, además, al pasar la muestra por el citómetro, les enseñamos a compensar automáticamente usando beads de compensación, ya que es más rápido realizando paneles multiparamétricos.

- Los alumnos analizaron los resultados donde pudieron resolver el caso práctico.

Evaluación de las actividades. Se emplearon formularios para evaluar los conocimientos de los alumnos y una encuesta final para saber la satisfacción de los alumnos con las actividades realizadas inmediatamente tras las mismas

4 Recursos humanos

Para la realización de este proyecto hemos contado con la participación de los miembros del proyecto presentados inicialmente, excepto una baja de un miembro que se realizó por motivos laborales, ya que finalizó su contrato y vínculo con la UCM (Marina Mazariegos León) pero que, a su vez, se incorporó Sara González García, una PDI que ha aportado sus conocimientos y ha ayudado en la elaboración de la práctica de este proyecto.

Las tareas desempeñadas se han distribuido de la siguiente forma:

- Responsable de la gestión del proyecto: Aránzazu Cruz Adalia
- Organización de los alumnos: María Esther Lafuente Duarte y María José Recio Hoyas
- Elaboración de guiones del programa: Raquel Ana Castillo González, Lucía Sancho Temiño y Ignacio Juárez Martín
- Elaboración de las muestras usadas en las prácticas: Sara González García y Ignacio Juárez Martín
- Elaboración de encuestas al alumnado: Raquel Ana Castillo González, Lucía Sancho Temiño
- Diseño y práctica con el software de compensación de citometría de flujo: Pedro Antonio Reche Gallardo
- Participación en sesiones como profesorado: Aranzazu Cruz Adalia, Carlos Cabañas, Ignacio Juárez Martín, Raquel Castillo, Lucía Sancho y Héctor Fernando Peláez Prestel
- Aplicabilidad de la citometría: Amalia Lamana, y Jesús Osuna
- Distribución y análisis de encuestas: Sara González García y Aranzazu Cruz Adalia

5 Desarrollo de las actividades

Actividad 1:

- Se anunció y se informó sobre las prácticas tanto en clase de Inmunología Molecular de Inglés y Español como en el Campus Virtual. Dos semanas antes de la práctica, se mandó un recordatorio al alumnado donde se adjuntaba el laboratorio donde serían las prácticas por cada grupo, fecha y horario concreto.

Actividad 2:

GRUPOS DE NIVEL "INICIACION EN CITOMETRIA DE FLUJO"

- Se prepararon previamente las muestras a utilizar en la práctica. Se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PMBC) 3 días antes y se activaron 24 h antes de la práctica la mitad de la muestra con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Previamente, ya habíamos puesto a punto a qué concentración y tiempo usarla para

observar los cambios en los antígenos que íbamos a cuantificar con el citómetro de flujo para que observaran los alumnos en la clase (Figura 1).

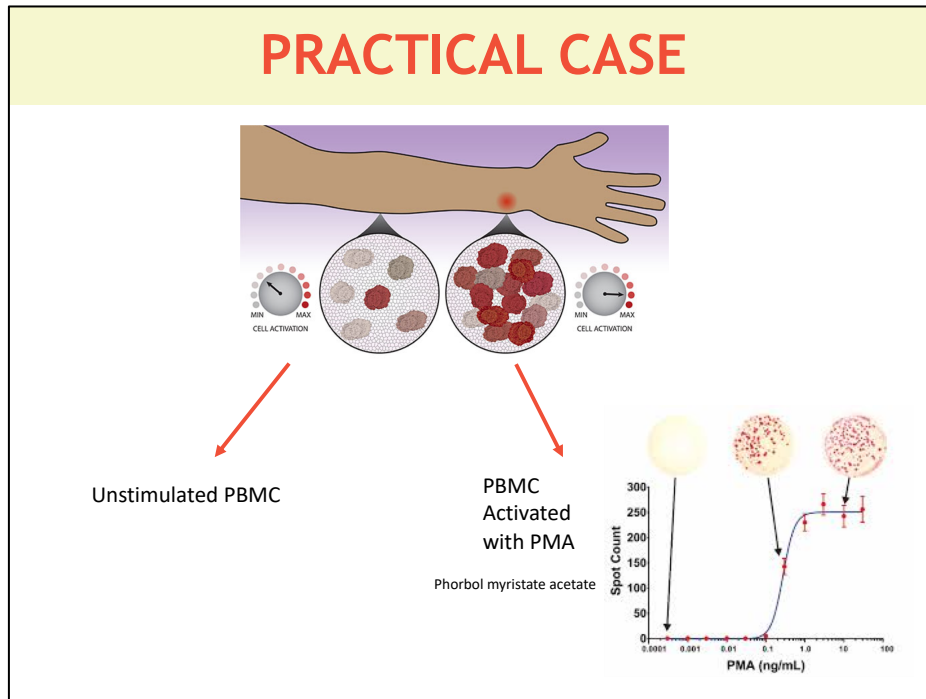


Figura 1. Caso práctico. PBMC sin activar o estimuladas con PMA durante 24h.

- Se realizó una explicación básica sobre la citometría de flujo y sus aplicaciones (Figura 2).

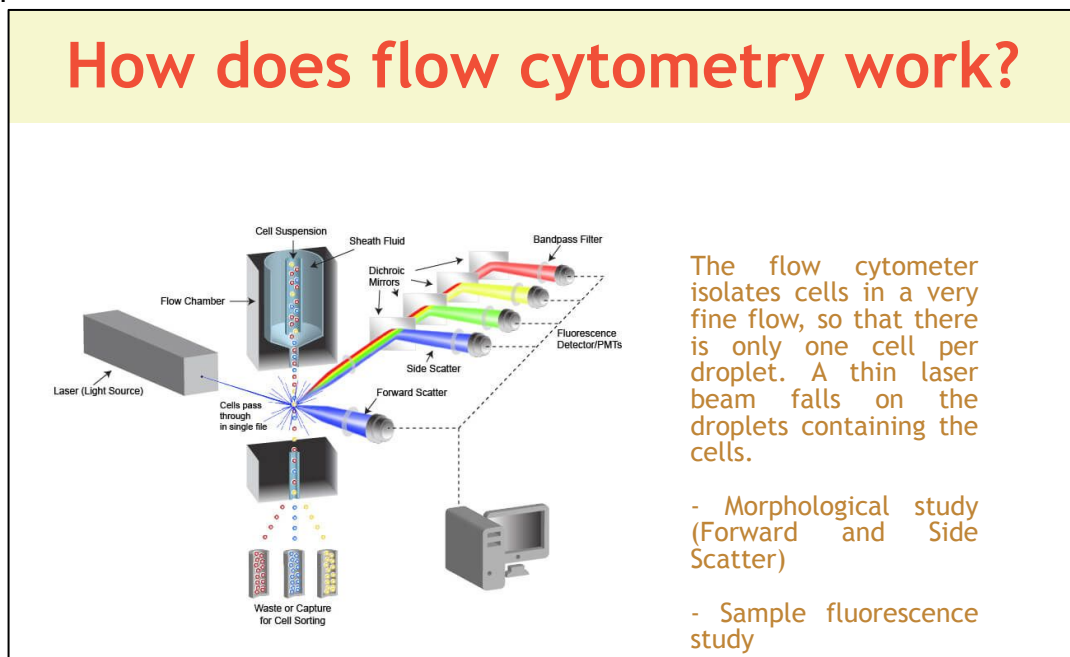


Figura 2. Explicación básica de la citometría de flujo.

- Se realizó una simulación práctica de cómo compensar el citómetro de flujo con una herramienta informática diseñada por el Dr. Pedro Antonio Reche Gallardo. Ellos podían hacerlo individualmente con el software que pudieron descargar en sus móviles o portátiles y así aprender de manera eficiente y didáctica.
- Se explicó cómo diseñar paneles multiparamétricos con diferentes citómetros de flujo. En grupos de 2 o 3 personas tuvieron que discutir e investigar con fuentes de información online que habíamos explicado previamente, como hacer el diseño de un panel aplicado al caso práctico expuesto en clase.
- Se explicaron los controles negativos y positivos necesarios para realizar un experimento de citometría de flujo, fundamentales en la metodología científica (Figura 3).

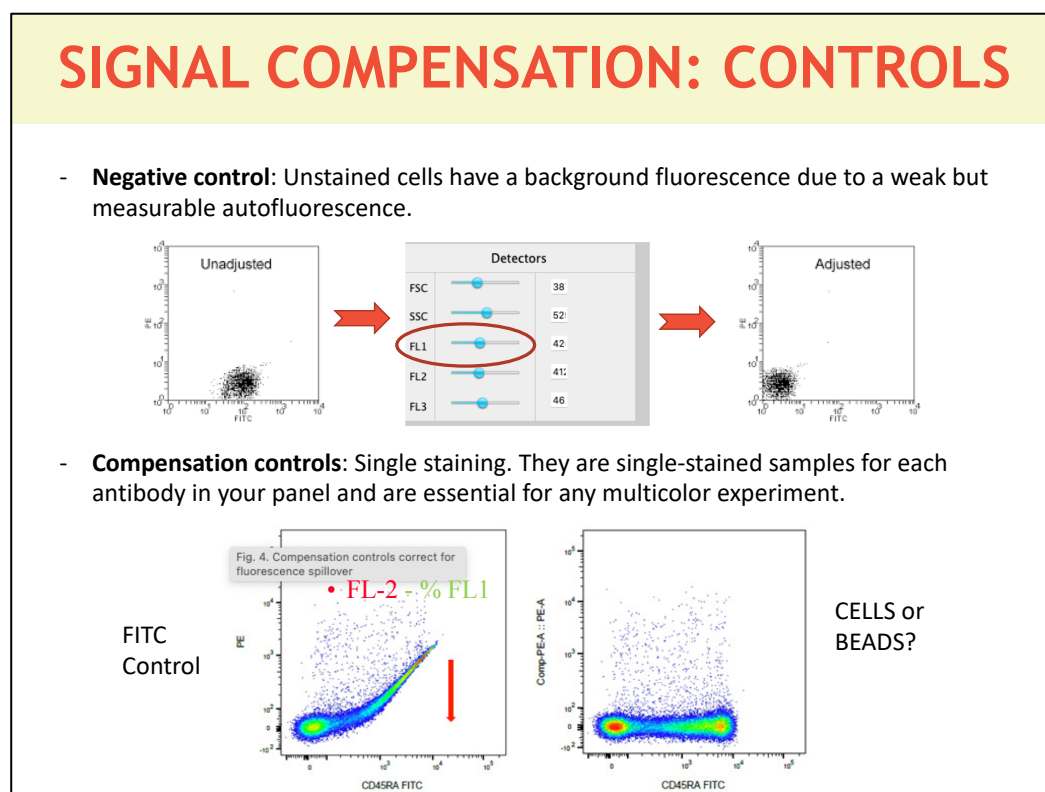


Figura 3. Controles necesarios para la citometría de flujo.

- Una vez discutido el panel que íbamos a usar para caracterizar el caso práctico expuesto, se explicó la metodología y el protocolo que tenían que seguir para hacer la práctica.
- Recogieron las células sin activar y activadas del cultivo y las incubaron con anticuerpos fluorescentes que reconocían las proteínas de membrana cuya expresión se altera de manera significativa (bien aumentando o bien disminuyendo) cuando un linfocito o monocito se activa.
- Se pasaron las muestras por el citómetro de flujo BD FACSCelesta, que tiene 3 láseres, pudiendo analizar hasta 14 parámetros (Foto 1).



Foto 1. Citómetro de flujo usado para las prácticas: BD FACSCelesta

- Finalmente, se discutieron los resultados obtenidos y se analizaron en el Software de análisis FlowJo.

GRUPOS DE NIVEL “AVANZADO EN CITOMETRIA DE FLUJO:

- Se prepararon previamente las muestras a utilizar en la práctica. Se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y líneas células estables de linfocitos T $\gamma\delta$ (PEER), linfocitos T $\alpha\beta$ (Jurkat), y linfocitos B (NALM6).
- Se realizó una simulación práctica de cómo compensar de manera manual el citómetro de flujo con una herramienta informática diseñada por el Dr. Pedro Antonio Reche Gallardo.
- Se explicó cómo diseñar paneles multiparamétricos con diferentes citómetros de flujo en detalle para el grupo de conocimientos avanzados (Figura 4)

Considerations before panel design



Biological questions

- Target cells
- Key molecules/targets
- Proper antibodies/reagents/procedure



Target identification

- Targets of interest – including viability
- Clarifying dumps
- Expression level
- Expression pattern
- Cellular location



Understanding instrument

- Type of instrument – conventional or spectral
- Optical configuration – lasers, filters
- Size of fluid path

Let's start designing the panel!

Figura 4. Consideraciones para diseñar un panel multiparamétrico.

- Se planteó a los estudiantes el caso práctico que tenían que resolver. Cada grupo, disponía de una muestra “problema” y tenían que averiguar qué tipo celular tenían en cada caso. Para ello, tenían que diseñar un panel multiparamétrico, usando diferentes anticuerpos y tenían que discutir cómo diseñarlo (Figura 5).

PRACTICAL CASE

PBMCs

B lymphocytes (NALM6): CD19+

Gamma delta lymphocytes (PEER): CD3+
TCR $\gamma\delta$ + CD4+

T lymphocytes (Jurkat): CD3+ CD4+
TCR $\alpha\beta$ +

PROTOCOL

- 1- Wash cells with FACS buffer
- 2- Incubate with **antibodies** 20 min at 4°C
- 3- Wash cells with FACS buffer
- 4- Resuspend in 300 ul FACS buffer
- 5- FLOW Cytometry

CD3 -?
TCRgd -?
CD8 -?
CD19 -?
CD4 -?
TCRab ?

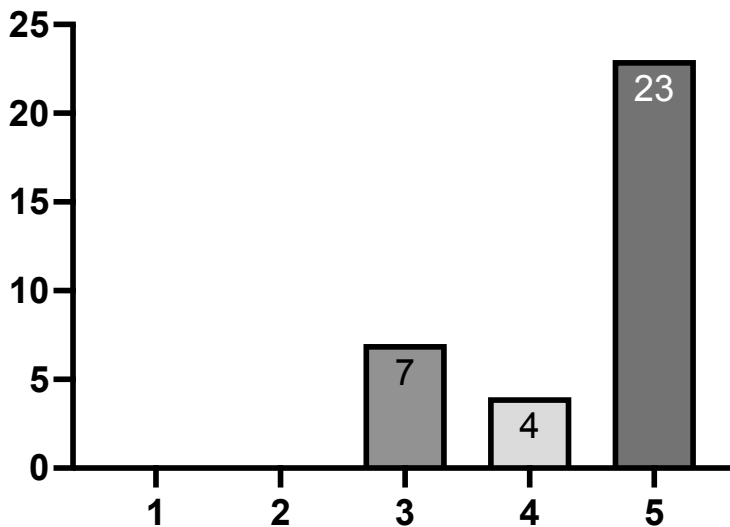
Figura 5. Caso práctico presentado al grupo de conocimientos avanzados.

- Se les proporcionó a continuación los anticuerpos para que ellos marcaran las células de cada muestra en el laboratorio.
- Se explicaron los controles negativos y positivos necesarios para realizar un experimento de citometría de flujo, fundamentales en la metodología científica. Se usaron beads de compensación para enseñar a los alumnos a compensar automáticamente en el citómetro de flujo.
- Se pasaron las muestras por el citómetro de flujo BD FACSCelesta, que tiene 3 láseres, pudiendo analizar hasta 14 parámetros (Foto 1).
- Finalmente, se discutieron los resultados obtenidos y realizaron un cuestionario para evaluar los conocimientos adquiridos (anexo II).

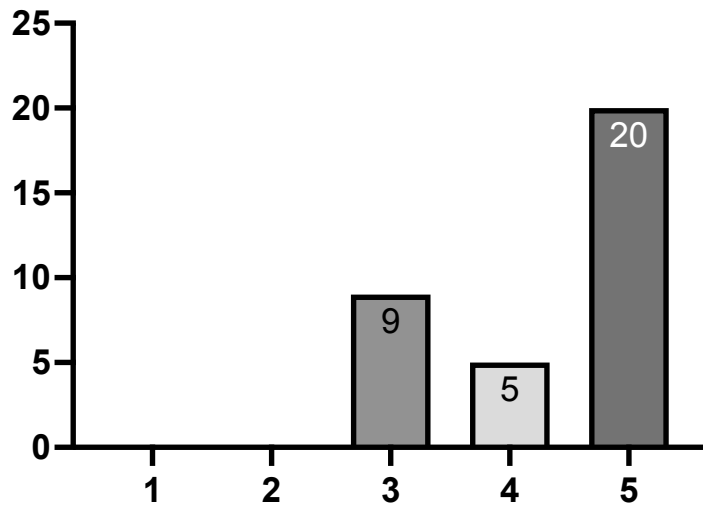
6 Anexo I. Valoración de las actividades por parte del alumnado

Valorar del 0 al 5 siendo 0 nada conforme y 5 totalmente conforme

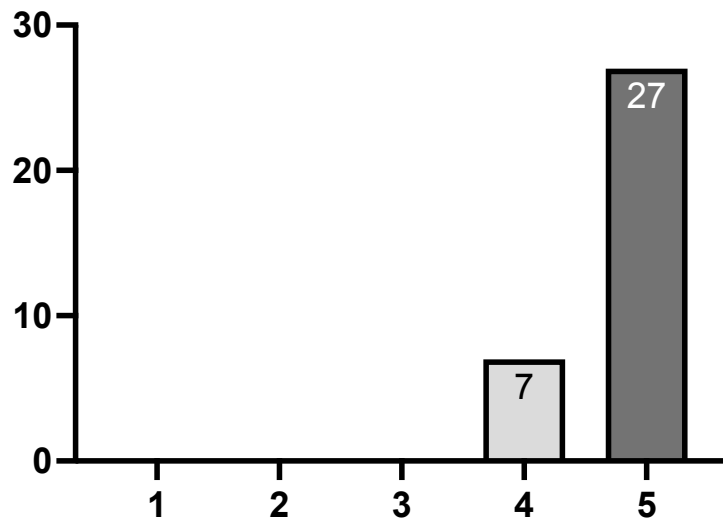
1. Adecuación de las prácticas al contenido de la asignatura.
Nº encuestados: 34



2. Contribución de las prácticas a la formación
Nº encuestados: 34

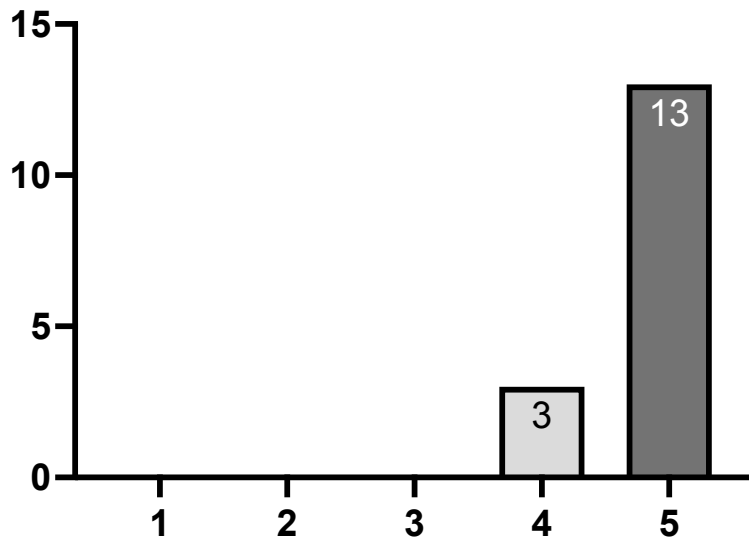


3. Claridad de las diapositivas y explicación
 Nº encuestados: 34

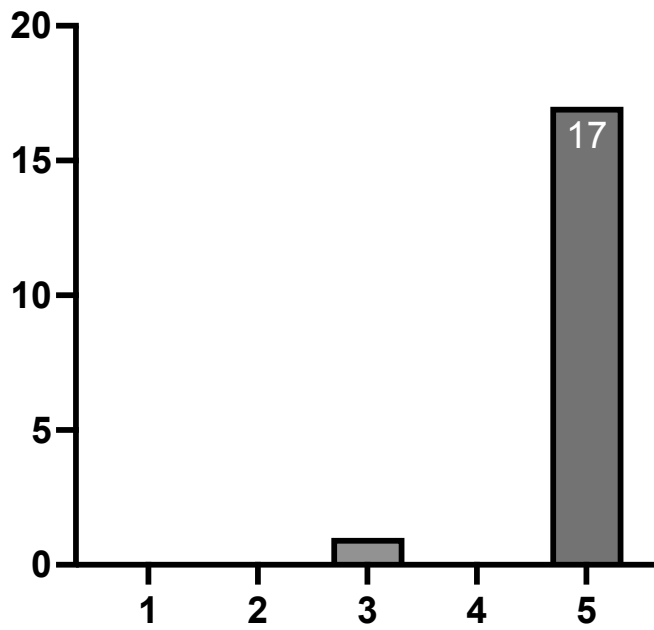


4. Contribución del profesor en el buen funcionamiento de la práctica

- Grupo dirigido por la Dr. Aranzazu Cruz Adalia
 Nº encuestados: 16

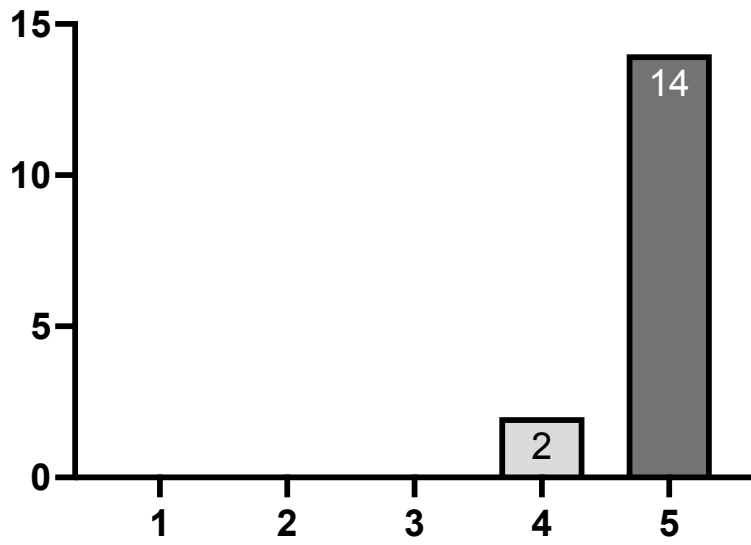


- Grupo dirigido por el Dr. Ignacio Juárez Martín
 Nº encuestados: 18

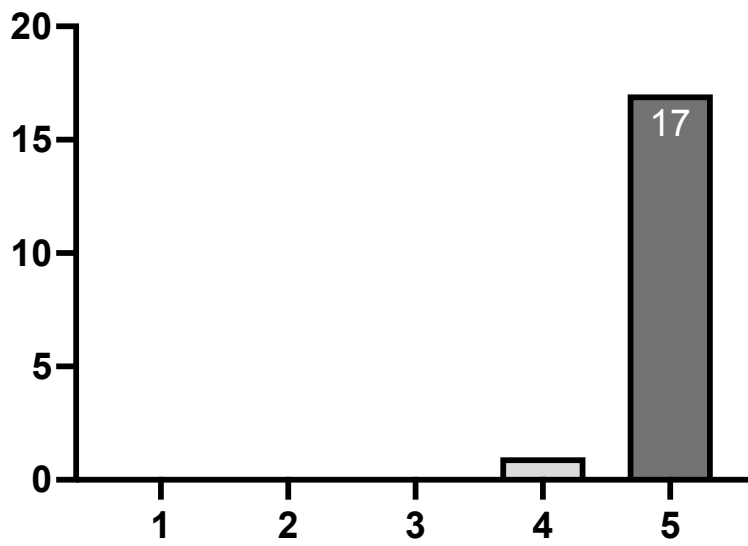


El profesor promueve el interés del alumno

- Grupo dirigido por la Dr. Aranzazu Cruz Adalia
 Nº encuestados: 16



- Grupo dirigido por el Dr. Ignacio Juárez Martín
Nº encuestados: 18



7 Anexo II. Cuestionario alumnos para evaluación de los conocimientos adquiridos.

Proyecto de Innovación Docente 2023-24: número 112
Aplicación de la citometría de flujo como herramienta para el estudio de la Inmunología Molecular: nivel AVANZADO

1. Teniendo en cuenta el siguiente panel:

Antígeno	Fluorocromo
CD3	PE
CD4	APC
CD45	PerCP
IL-17	FITC

- ¿Crees que está diseñado correctamente? ¿Podrías optimizar el diseño?
2. ¿Qué controles son necesarios para llevar a cabo un experimento de citometría de forma correcta? Descríbelos brevemente.
3. Teniendo en cuenta tu experiencia y lo que has aprendido en esta práctica ¿qué usarías para hacer los controles de compensación, bolas o células?
4. En caso de usar un anticuerpo con un fluorocromo en tándem ¿qué consideraciones debes tener en cuenta? ¿Cómo podrías prevenirlas?
5. ¿Podrías usar dos anticuerpos que estén en PE y Percp simultáneamente teniendo en cuenta que son excitados por el mismo láser (azul)? ¿Por qué?
6. Cuando compras un anticuerpo nuevo ¿por qué es conveniente titularlo? ¿Qué parámetro hay que considerar?