



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Proyecto de Innovación

Convocatoria 2024/2025

Nº de proyecto: 48

Exploración de la Inmunología Molecular a través de la Citometría
de Flujo: Una Perspectiva Aplicada

Responsable del proyecto:

Aránzazu 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 2024-25 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 cuatro grupos, 3 de iniciación y 1 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. Los estudiantes aprendieron las nociones básicas para diseñar un panel multiparamétrico y llevaron a cabo la técnica de marcaje. Además, se familiarizaron con el citómetro de flujo, pasando sus muestras y aprendieron a analizar e interpretar los resultados obtenidos. Para optimizar las propuestas de los estudiantes del curso anterior, se subdividieron las prácticas en grupos reducidos y

distribuyeron en dos días, y dos laboratorios diferentes cada día, utilizando dos citómetros de flujo disponibles en el Departamento, pertenecientes al CAI, y así permitiendo que cada grupo trabajara en el citómetro de flujo durante más tiempo, de manera autónoma, bajo supervisión.

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 80% de los encuestados consideran que las actividades cubrieron sus expectativas, con un alto nivel de satisfacción, ya que el 70% de los encuestados valoraron la adecuación de las prácticas al contenido de la asignatura con la máxima nota (5 sobre 5) y un 21% con 4 sobre 5 (Anexo I).

- Un 79% valoró esta práctica como muy buena contribución para su formación (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 4,92 sobre 5 tanto en el caso de la Dr. Aránzazu Cruz Adalia y 4,8 en el caso de Dr. Raquel Reyes Manzanos (Anexo I).

Hay que destacar que las encuestas de evaluación de los alumnos en este proyecto 24/25 han mejorado 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:

“Buena visión de la enseñanza” “Me ha encantado interpretar los datos”.

“Como mejorar: proponer muestras con enfermedades autoinmunes “

“Añadiría para otro año una explicación más extensa de cómo hacer los “gatings” en el citómetro y el análisis”

“Lo que más me ha gustado es interpretar y analizar los datos en el software de análisis y manejar el citómetro”

“Añadiría más sesiones de prácticas”

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

“Práctica muy útil para comprender el uso de la citometría de flujo”

“Lo que más me ha gustado es el protocolo de diseño de paneles, pero ajustaría la práctica porque se hace larga para el grupo de avanzados”

“Analizar muestras de compañeros de clase, o marcadores de agotamiento comparado con donantes jóvenes o con donantes longevos”

“Creo firmemente que la práctica debe mantenerse los próximos años, es muy interesante”

Dificultades y Limitaciones:

La clase del grupo de conocimientos avanzados es más extensa y quizá estaría bien dividirla en 2, ya que se hace muy larga. Al año que viene, podríamos plantear realizar dos días de prácticas, una de adquisición de los datos y la segunda de análisis e interpretación de los resultados.

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. Finalmente, fueron 4 grupos, 3 de iniciación y 1 de avanzado, con 10 alumnos por grupo máximo para que fueran más personalizadas.

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 Máster 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 bolas de compensación, ya que es más rápido realizando paneles multiparamétricos.
- Los alumnos analizaron los resultados donde pudieron resolver el caso práctico, explicándoles el software Flowjo.

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 (Carlos Cabañas) pero que, a su vez, se incorporó Alba Seguí Pérez, una estudiante predoctoral que ha ayudado en la preparación y 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 Pedro Lorenzo Majano.
- Elaboración de guiones del programa: Raquel Ana Castillo González, Lucía Sancho Temiño y Alba Seguí Pérez.
- Elaboración de las muestras usadas en las prácticas: Raquel Reyes Manzanos, Raquel Ana Castillo González, Lucía Sancho Temiño y Alejandro Chozas Hernández.
- Elaboración de encuestas al alumnado: Raquel Ana Castillo González y Alba Seguí Pérez.
- Participación en sesiones como profesorado: **Aránzazu Cruz Adalia, Raquel Reyes Manzanos**, Raquel Ana Castillo González, Lucía Sancho Temiño y Alba Seguí Pérez.
- Aplicabilidad de la citometría: Aránzazu Cruz Adalia y Jesús Osuna
- Distribución y análisis de encuestas: Aránzazu Cruz Adalia

5. Desarrollo de las actividades

Actividad 1:

- Se anunció y se informó sobre las prácticas tanto en clase de Inmunología Molecular impartida en los idiomas Inglés y en 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).

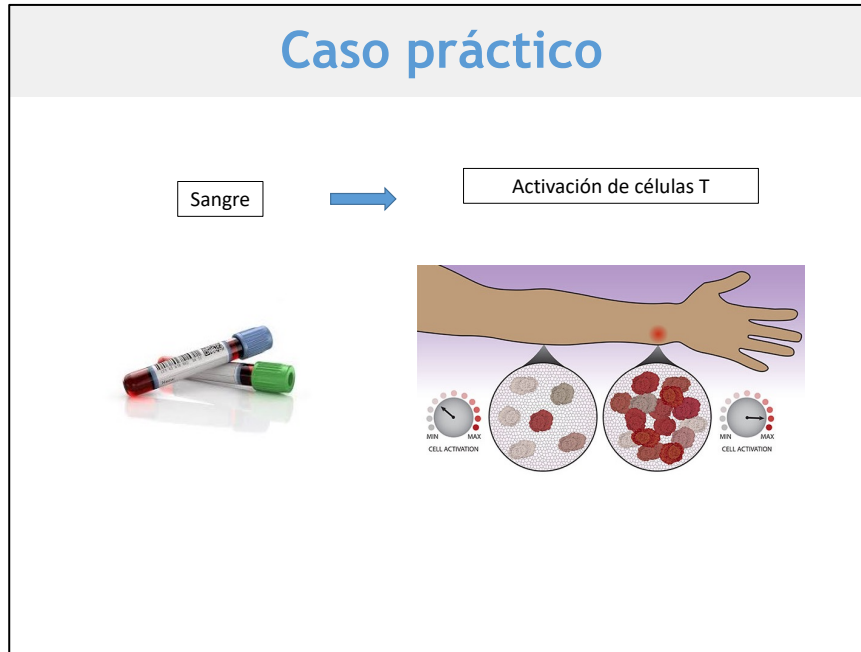


Figura 1. Caso práctico. PBMC sin activar o estimuladas con PMA durante 24h.

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

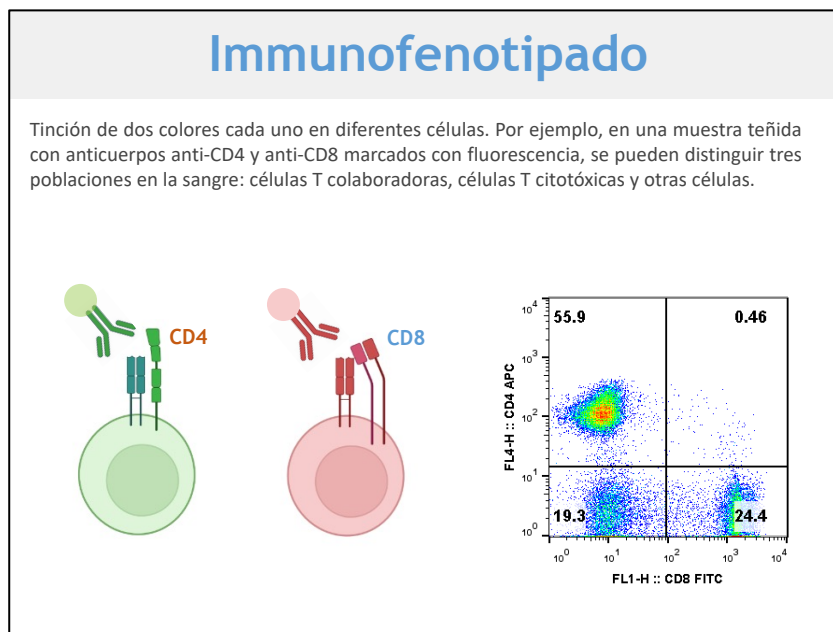


Figura 2. Explicación básica de la citometría de flujo.

- 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).

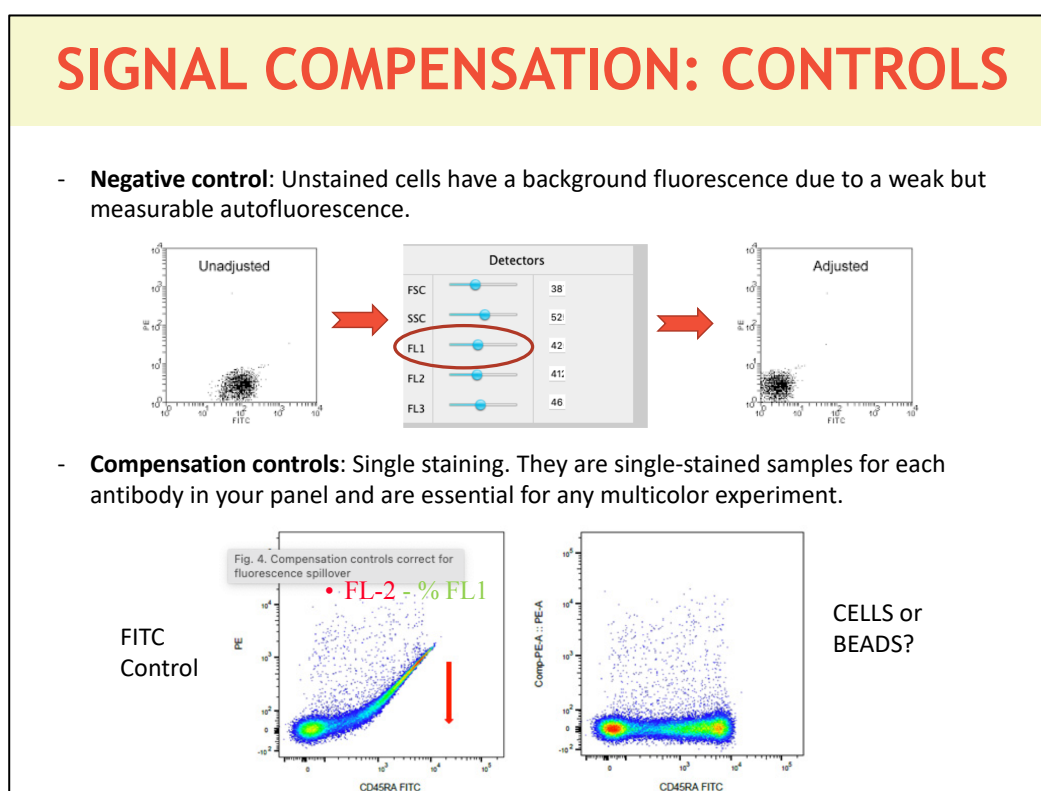


Figura 3. Controles necesarios para la citometría de flujo.

- 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.
- Ya que nuestro objetivo este curso escolar, como mejora al anterior, era que los alumnos manejaran el citómetro de flujo, bajo supervisión, durante más tiempo para familiarizándose mejor con la técnica, se dividieron cada grupo en parejas y pasaron las muestras en dos diferentes citómetros disponibles en el departamento: BD FACSCelesta

(foto 1) y BD Calibur (foto 2). Además, compensaron con controles de compensación de manera manual o automática.



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



Foto 2. Citómetro de flujo usado para las prácticas: BD FACSCalibur

- Finalmente, se discutieron los resultados obtenidos y se analizaron en el software de análisis FlowJo y se discutieron los resultados obtenidos y realizaron un cuestionario para evaluar los conocimientos adquiridos (anexo II).

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)

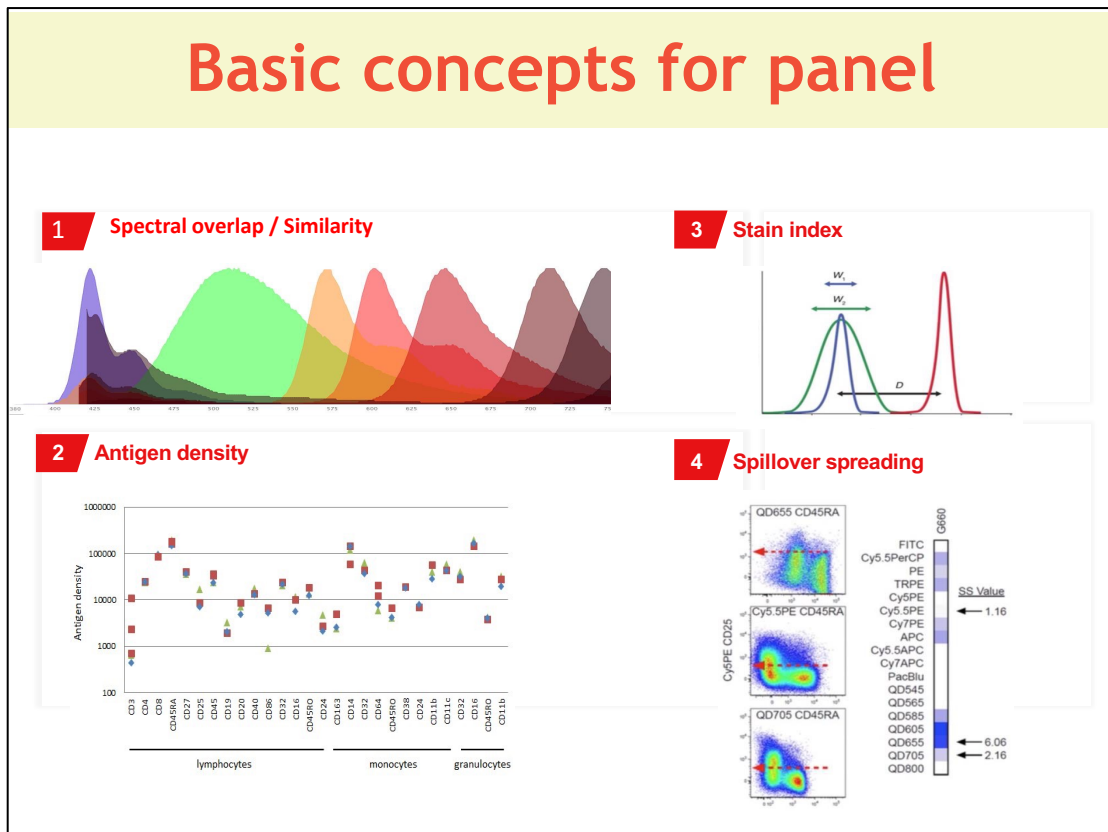


Figura 4. Consideraciones para diseñar un panel multiparamétrico.

- 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).

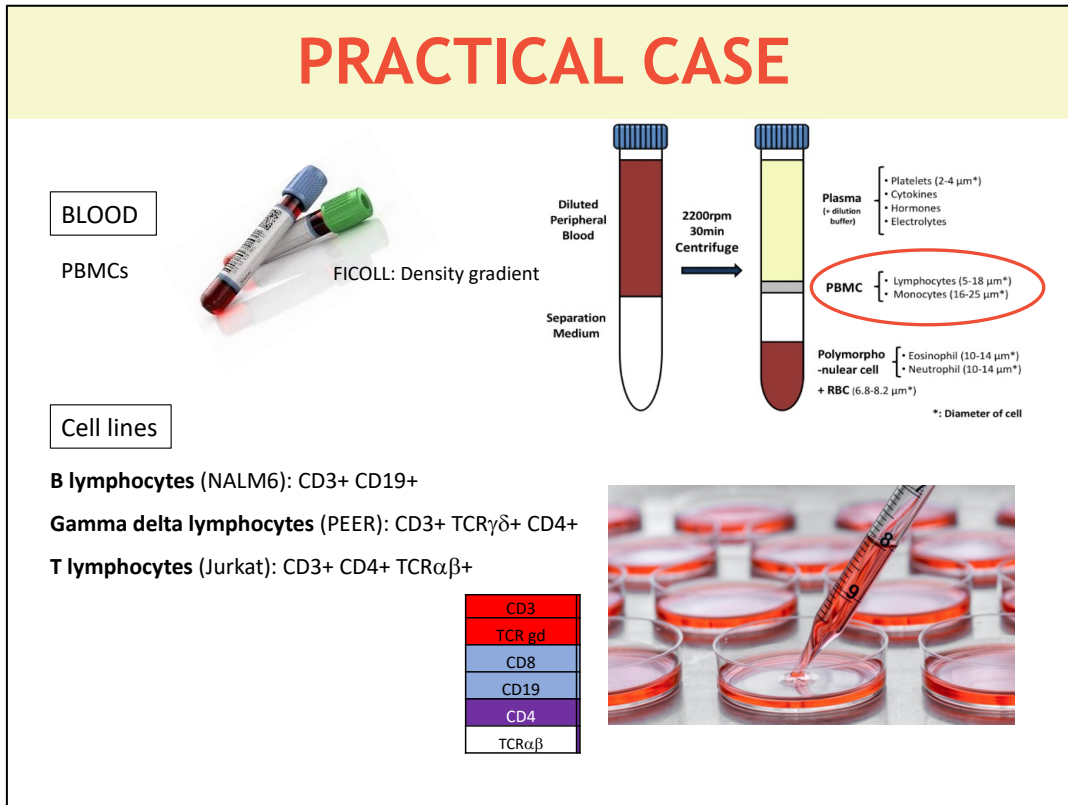


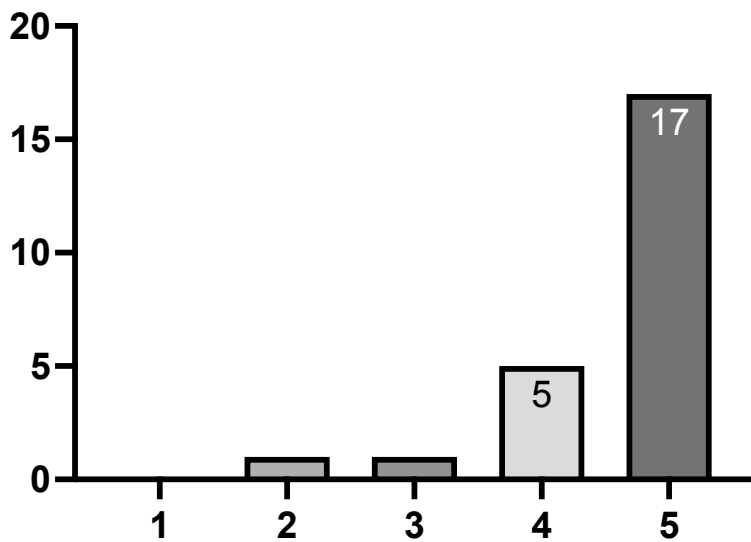
Figura 5. Caso práctico presentado al grupo de conocimientos avanzados.

- 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 bolas de compensación para enseñar a los alumnos a compensar automáticamente en el citómetro de flujo.
- Ya que nuestro objetivo era que los alumnos manejaran el citómetro de flujo, bajo supervisión, durante más tiempo para familiarizándose mejor con la técnica, se dividieron cada grupo en parejas y pasaron las muestras en dos diferentes citómetros disponibles en el departamento: BD FACSCelesta (foto 1) y BD Calibur (foto 2). Además, compensaron con controles de compensación de manera manual o automática.
- Finalmente, se discutieron los resultados obtenidos y se analizaron en el software de análisis FlowJo y se discutieron los resultados obtenidos y realizaron un cuestionario para evaluar los conocimientos adquiridos (anexo III).

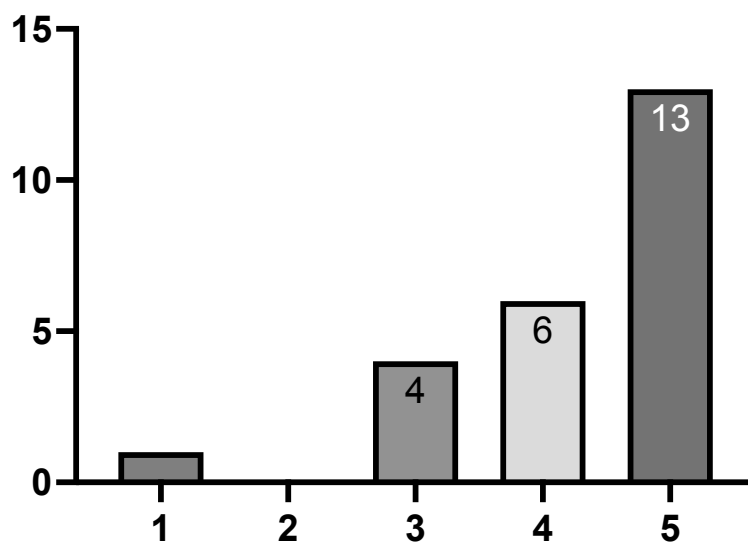
6. Anexo I. Valoración de las actividades por parte del alumnado

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: 24



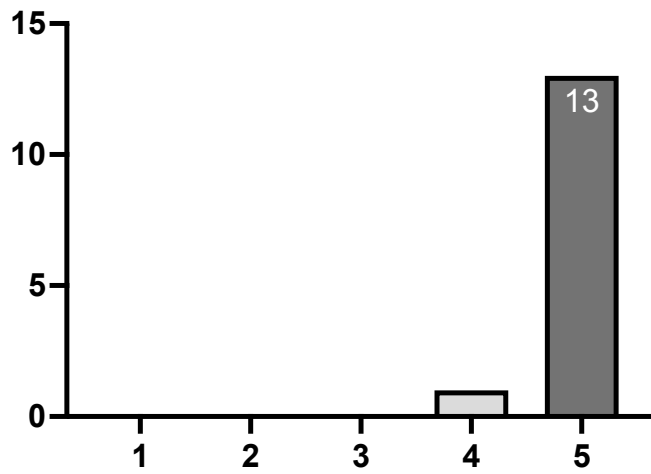
2. Contribución de las prácticas a la formación
Nº encuestados: 24



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

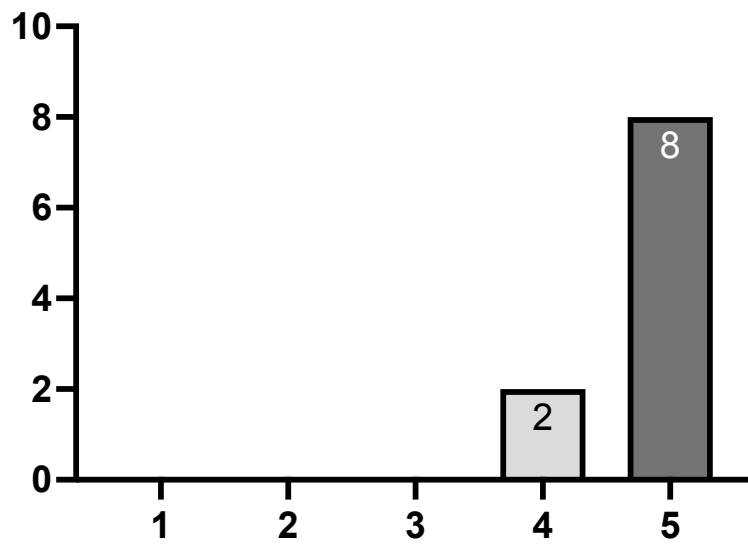
- Grupo dirigido por la Dr. Aránzazu Cruz Adalia

Nº encuestados: 14



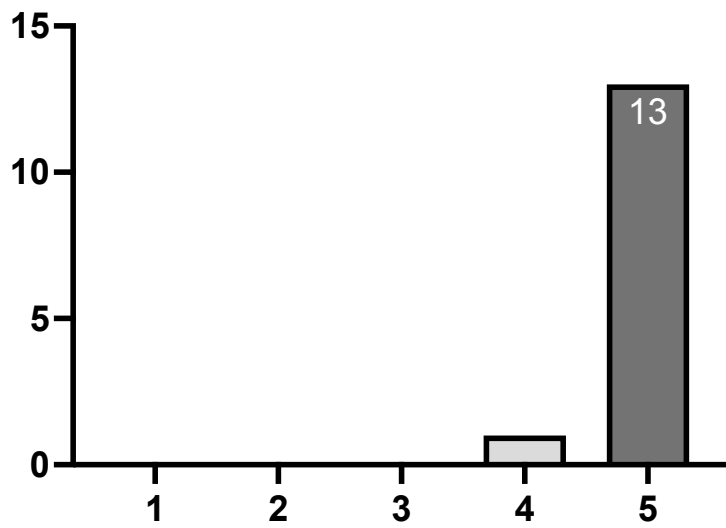
- Grupo dirigido por el Dr. Raquel Reyes Manzanos

Nº encuestados: 10

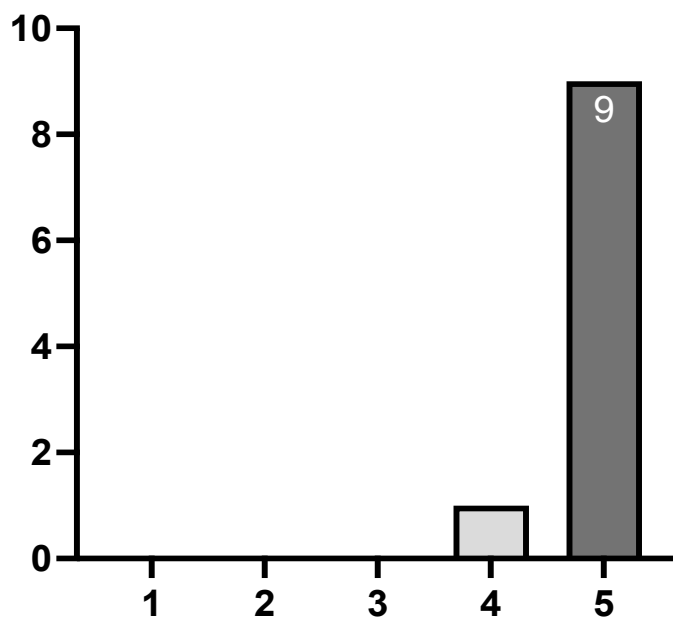


El profesor promueve el interés del alumno

- Grupo dirigido por la Dr. Aránzazu Cruz Adalia
Nº encuestados: 14



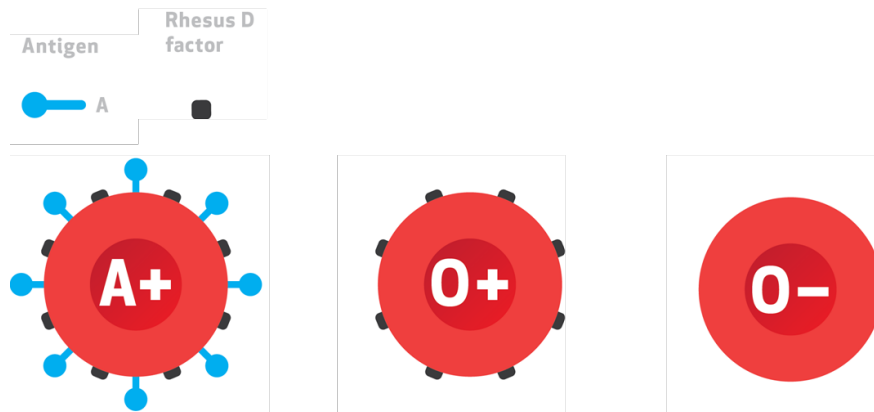
- Grupo dirigido por el Dr. Raquel Reyes Manzanos
Nº encuestados: 10



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

Proyecto de Innovación Docente 2024-25: número 48 Aplicación de la citometría de flujo como herramienta para el estudio de la Inmunología Molecular: Nivel Básico

1. Queremos utilizar citometría de flujo para fenotipar el grupo sanguíneo de unas muestras ¿Qué marcadores usarías para distinguir estas muestras? Dibuja cómo se vería el resultado.



2. ¿Qué controles son necesarios para llevar a cabo un experimento de citometría de forma correcta? Descríbelos brevemente.
3. ¿Podrías usar dos anticuerpos que estén en PE y FITC simultáneamente teniendo en cuenta que son excitados por el mismo láser (azul)? ¿Por qué?
4. En cuanto al análisis de resultados de citometría. ¿Permite el citómetro analizar cuantitativamente la expresión de un marcador? ¿Qué controles necesitarías para esto?
5. En la citometría de flujo, dos fluoróforos son compatibles cuando
 - A) Se excitan con la misma longitud de onda
 - B) Se excitan con distinta longitud de onda
 - C) Emiten luz con la misma longitud de onda
 - D) Emiten luz con distinta longitud de onda
6. La citometría de flujo se puede utilizar en inmunología para

- A) Expresión de citoquinas
- B) Estudios de membranas
- C) Ensayos de muerte celular
- D) Todas las anteriores

7. Dos fluoróforos tienen picos de emisión en la misma longitud de onda, pero tienen espectros de emisión distintos. ¿Qué tipo de citómetro utilizarías para distinguirlos?

8. **Anexo III. Cuestionario para los alumnos de nivel avanzado para la evaluación de los conocimientos adquiridos.**

Proyecto de Innovación Docente 2024-25: número 48 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?