



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Fundamentos de citometría de flujo.

Flow cytometry basics.

Patiño Uriostegui, Linda Nelly^{1*} y Velazquez Cruz, Rafael¹.

1. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

*Correspondencia: INMEGEN, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, C.P. 14610, CDMX, México.
Tel +52(55)53501900 ext 1190, inpatino@inmegen.gob.mx

Resumen

La citometría de flujo es una herramienta biotecnológica que nos permite medir de manera rápida características físicas y químicas de manera individual de cada una de las células suspendidas en una solución. Esta tecnología nos permite evaluar múltiples parámetros de manera simultánea en una muestra, lo que la hace ser una tecnología analítica de gran alcance. En la actualidad es empleada en la clínica, para uso diagnóstico de enfermedades hematológicas e inmunes, así como en la investigación básica, en el desarrollo de experimentos complejos para la comprensión de estudios referentes a la salud. Por lo que es importante tomar en cuenta los requerimientos necesarios para el buen diseño del panel de anticuerpos, el manejo de las muestras y la optimización de los ajustes del citómetro para obtener resultados confiables y precisos.

Palabras claves: citometría de flujo, fluoróforos, parámetros celulares, muestra, optimización.

Abstract

Flow cytometry is a biotechnological tool that allows us to quickly measure individual physical and chemical characteristics of each of the cells suspended in a solution. This technology allows us to evaluate multiple parameters simultaneously in a sample, making it a powerful analytical technology. It is currently used in the clinic, for the diagnostic of hematological and immune diseases, as well as in basic research, in the development of complex experiments for the understanding of studies related to health. Therefore, it is crucial to consider the requirements for the design of the antibody panel, the handling of the samples and the optimization of the cytometer settings to obtain reliable and accurate results.

Keywords: flow cytometry, fluorophores, cellular parameters, sample, optimization.

Introducción

La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular, ha logrado expandirse desde laboratorios de investigación básica a laboratorios clínicos donde se ocupa para el diagnóstico de algunas enfermedades. Esta técnica, tiene una amplia

utilidad en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica, biología de la reproducción y biología celular.

La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible la detección y la cuantificación de receptores de superficie, del citoplasma celular, así como la detección de procesos bioquímicos

permitiendo identificar subpoblaciones celulares (1).

La citometría de flujo es un método analítico que nos permite una medición rápida y cuantitativa de múltiples parámetros en partículas (células, bacterias, perlas, etc) individuales que se encuentren en suspensión. Se define como parámetro a la característica física o química de una célula que puede ayudar a identificarla dentro de una población celular.

Para realizar la medición de algunos de estos parámetros se requiere que la muestra se encuentre teñida con algún fluoróforo que al ser adquirida en un citómetro, cada partícula de la muestra pasará alineada una detrás de otra para ser interrogada una por una por un haz de luz, dando como resultado una dispersión de luz y la emisión de fluorescencia producto de la excitación del fluoróforo (2). La señal luminosa o fluorescencia emitida por los fluoróforos al ser excitados en la muestra, es recogida y digitalizada en una computadora.

Es de gran relevancia para el desarrollo confiable de esta técnica tener claro el flujo de trabajo del marcaje de las muestras, así como la preparación del citómetro y la adquisición de cada una de las muestras hasta la interpretación de los resultados.

Fluoróforos

Los fluoróforos permiten a los investigadores y clínicos detectar componentes particulares y evaluar procesos bioquímicos en células vivas, con una alta sensibilidad.

La citometría de flujo se basa en la medición de la emisión de fluorescencia de los fluoróforos que se unen a los anticuerpos de interés. Los fluoróforos son moléculas capaces de absorber energía después de ser excitados con un haz de luz y emitir parte de esa energía en forma de luz fluorescente con una longitud de onda más larga que la luz excitante.

Los fluoróforos sólo se excitan si se iluminan con luz de la longitud de onda correspondiente. La longitud de onda depende del espectro de absorción del fluoróforo y debe garantizarse que se suministre una cantidad apropiada de energía para elevar los electrones al estado excitado (3).

Los fluoróforos y su fluorescencia resultante es un instrumento poderoso en la citometría de flujo para la detección de moléculas específicas y

procesos bioquímicos en diferentes muestras. En la actualidad existen una gran variedad de fluoróforos comercialmente disponibles los cuales difieren en sus características de excitación, emisión y brillo, las cuales hay que tomar en cuenta al momento del diseño de nuestro panel de tinción, en la tabla 1 se muestra una guía de selección de fluoróforos.

Tabla 1. Guía de selección de fluoróforos. Se muestran algunos de los fluoróforos, con su emisión de color, su excitación y emisión máxima, así como la longitud de onda del láser a la cual se excita.

Fluorochrome	Emission Color	Excitation Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)	Em-Max (nm)
AF488	Green	495	488	519
FITC(fluorescein)	Green	493	488	525
AF430	Green	434	405	541
PE(R-Phycoerythrin)	Yellow	496, 565	488	575
PE/TR	Orange	496, 565	488	613
PI(Propidium Iodide)	Orange	305, 540	325, 360, 488	620
7-AAD (7-aminoactinomycin D)	Red	546	488	647
APC(allophycocyanin)	Red	645	595, 633, 635, 647	660
AF647	Red	650	595, 633, 635, 647	668
PE/Cyanine5	Red	496, 565	488	670
PerCP	Red	482	488	675
PE/Cyanine5.5	Far Red	496, 565	488	690
PerCP/Cyanine5.5	Far Red	482	488	690
PE/Cyanine7	Infrared	496, 565	488	774
APC/Cyanine7	Infrared	650	595, 633, 635, 647	774

Estructura de un citómetro

La citometría de flujo tiene la capacidad de medir simultáneamente múltiples parámetros celulares en una misma célula, esto se debe a la detección de la dispersión de luz, que se produce al momento de ser interrogada una por una de las células por un haz de luz, permitiendo así obtener el tamaño, complejidad y fluorescencia proveniente de cualquier componente celular o función, que se encuentre marcada con un colorante fluorescente o fluoróforo sensible a la fuente de luz (4) (Figura 1).

Un citómetro de flujo está compuesto por tres principales sistemas:

- *Fluidos.* Para introducir y alinear las células al momento de ser interrogadas.

- *Óptico*. Una fuente de excitación y colección óptica para generar y coleccionar las señales de luz.
- *Electrónico*. Conversión de señales ópticas a señales electrónicas.

Estos tres sistemas sumados con los avances en el diseño de programas de computación permiten el análisis de múltiples parámetros de una célula, así como un gran número de ellas.

1. Sistema de fluidos.

El sistema de fluidos se encarga de transportar y alinear las partículas de una muestra dentro de una celda o cámara de flujo al punto de intersección donde serán interrogadas con una fuente de luz para medir las diferentes características de las partículas (1). Es importante señalar que las células o partículas deben estar en suspensión para que el sistema de fluidos cumpla con su función (Figura 2A).

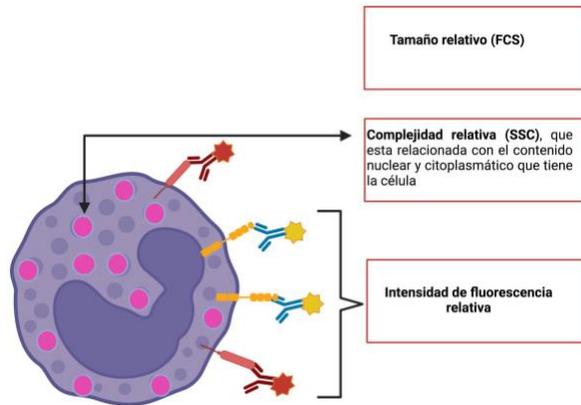


Figura 1. Parámetros analizados en citometría de Flujo. El tamaño esta dado por la dispersión de luz frontal que se origina cuando la célula o partícula pasa por el haz de luz, mientras que la dispersión lateral (SSC) proporciona información sobre la complejidad de la célula.

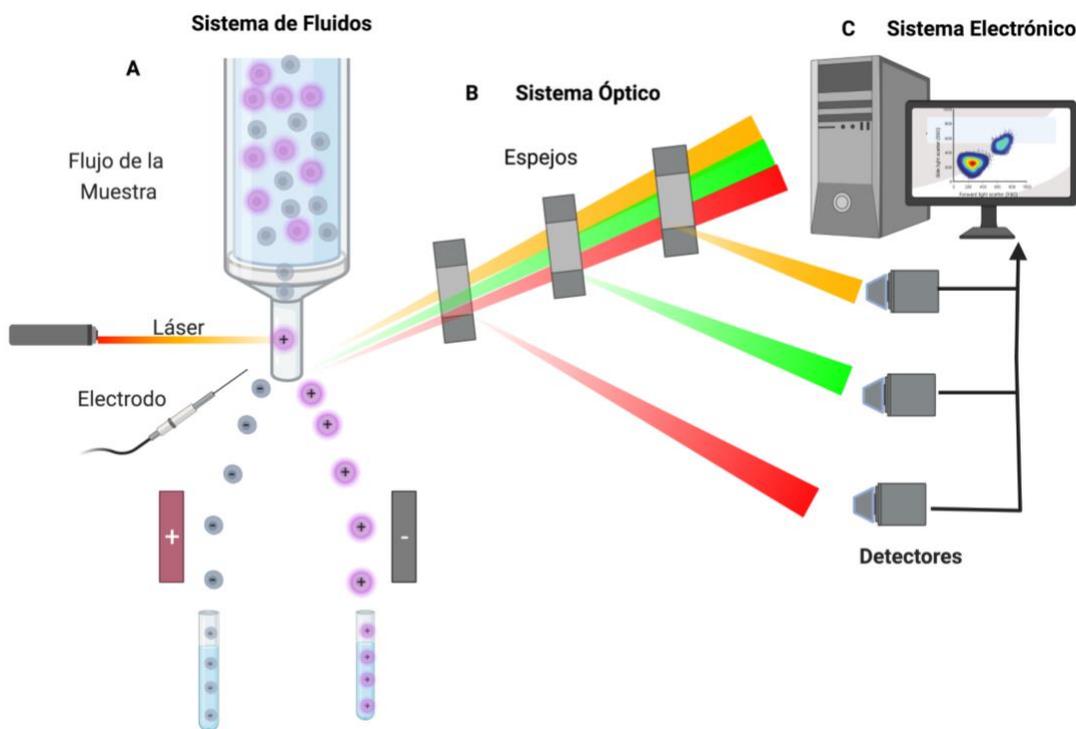


Figura 2. Componentes de un citómetro. Se indica los tres sistemas que componen a un citómetro, así como el flujo del procesamiento de la señal y la detección.

Hoy en día existen tres mecanismos para lograr la alineación o enfoque de las células o partículas a estudiar al momento de pasar por el punto de interrogación.

- El primer mecanismo de alineación utilizado es el enfoque hidrodinámico, que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente, conocida también como fluido envolvente y este puede ser agua o una solución

amortiguadora de fosfatos. El fluido envolvente mejora la precisión con la que las células se colocan en la región de observación o interrogación del citómetro, ya que restringe a las células en el centro del flujo, obligando a que pasen una por una, de manera continua (5). Algunos de los citómetros que utilizan este tipo de enfoque son los producidos por la empresa *Becton Dickinson*, un ejemplo de este tipo de alineación es el modelo BD FACSAria (Figura 3A).

- El enfoque acústico es una alineación independiente de fluidos, la muestras se transporta por el fluido y se inyectan las células o partículas a la cámara de flujo, sin embargo la

alineación se realiza por medio de ondas sonoras. El mecanismo de alineación acústica reduce la posibilidad de obstrucciones del sistema por la formación de agregados, un ejemplo de citómetro que utiliza este mecanismo es el modelo de *Applied Biosystems* AB ATTUNE (Figura 3B).

- Enfoque microcapilar, la alineación de las partículas está dada por el diámetro del capilar por el cual son inyectadas y transportadas por el fluido envolvente al punto de interrogación. Uno de los equipos más conocidos que presenta este tipo de enfoque es el modelo Guava de la marca *Millipore* (Figura 3C).

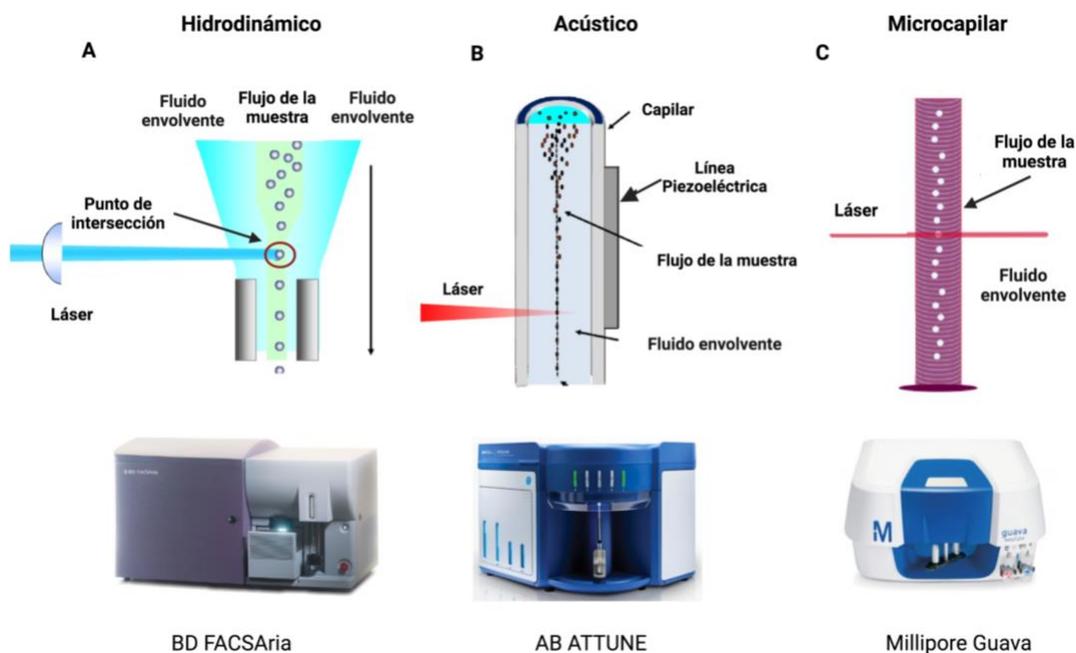


Figura 3. Sistemas de alineación de la muestra y representación de cada tipo de enfoque. A) Enfoque hidrodinámico el cual está dado por el fluido envolvente. B) Enfoque acústico, la alineación está dada por ondas sonoras. C) Enfoque microcapilar.

2. Sistema óptico

Este sistema se compone de una fuente de luz o láser que excita las partículas o células teñidas o sin teñir y la fuente de colección que se encarga de la detección de la desviación de luz y fluorescencias. La fuente de luz más común en los citómetros actuales son los de estado sólido y los de Helio-Neón enfriado por aire (1).

En la actualidad existen citómetros que cuentan con más de una fuente de luz, un ejemplo de lo

anterior, son los modelos FACS *Melody* y el FACSAria III que cuenta con un láser rojo de 633nm y uno violeta de 407nm además del láser azul de 488nm, algunos citómetros pueden expandir sus fuentes de luz incorporando el láser amarillo de 561nm, el verde de 532nm y el ultra-violeta (UV) de 350nm, la ventaja de estos citómetros es, que entre mayor número de fuentes de luz tenga el equipo, nos da la posibilidad de usar un mayor número de fluoróforos.

La óptica de colección consiste en lentes y filtros ópticos que permiten que las señales luminosas se dirijan a los detectores adecuados. Un lente de colección se encarga de dirigir la luz desviada frontalmente por la célula (FSC, por sus siglas en inglés “*forward scatter*”) hacia el detector correspondiente, mientras que otro lente se encarga de dirigir la luz desviada lateralmente (SSC, por sus siglas en inglés “*side scatter*”) al detector comprometido (5).

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 que refleja el tamaño de la célula. Por otro lado, la luz que se interna dentro de la célula, se encuentra con componentes intracelulares que desvían la luz en cualquier ángulo, esto se conoce como dispersión lateral o SSC y nos proporciona información de la complejidad de las células, la dispersión de luz que se toma en cuenta para calcular el parámetro SSC es la que tiene un ángulo de aproximadamente 90° (5) (Figura 4).

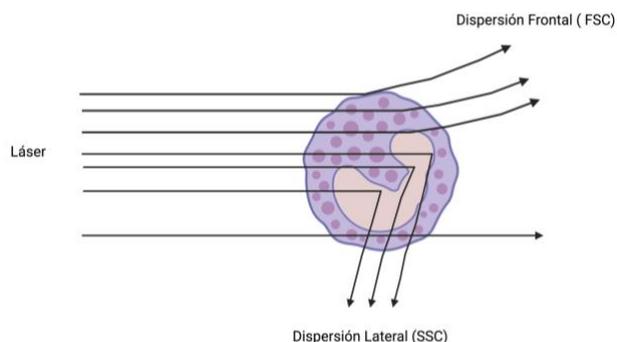


Figura 4. Dispersión de luz. El tamaño de la célula se obtiene por la dispersión frontal producida cuando el haz de luz incide en la membrana celular, mientras que la complejidad esta dada por la desviación lateral de la luz que se genera al incidir sobre los componentes intracelulares de la célula.

La fuente de colección es también la encargada de conducir las señales luminosas producto de la fluorescencia a los detectores adecuados proveniente de cualquier componente celular o

función, que se encuentre teñida con un colorante fluorescente o fluoróforo sensible a la fuente de luz (4) (Figura 2B).

3. Sistema electrónico

Las señales luminosas generadas cuando el láser incide en la célula son recolectadas por detectores de luz, que traducen las señales luminosas a señales electrónicas (2). Los dos tipos principales de detectores luminosos son los fotodiodos de silicón y los fotomultiplicadores. Los fotodiodos de silicón son utilizados principalmente para detectar la dispersión de luz frontal (FSC), la cual es una señal fuerte y los fotomultiplicadores, o PMT por sus siglas en inglés “*Photomultiplier tubes*”, por ser más sensibles a la luz son utilizados para captar señales más débiles, como la dispersión lateral (SSC) y fluorescencia (6).

Aplicaciones de la citometría de flujo

La citometría de flujo nos permite evaluar diferentes parámetros biológicos en las células de manera individual, evaluando tantos parámetros como anticuerpos se dispongan, teñidos con distintos fluoróforos en una misma célula, estos los podemos clasificar en 5 parámetros (Figura 5).

- Parámetros funcionales:** actividades enzimáticas, potencial de membrana, concentración de iones.
- Parámetros nucleares:** basados en el DNA, moléculas de regulación y expresión de genes.
- Parámetros de superficie:** componentes estructurales y dinámica de la superficie celular.
- Parámetros citoplasmáticos:** componentes intracelulares.
- Parámetros extracelulares:** moléculas de la dinámica de la secreción celular.

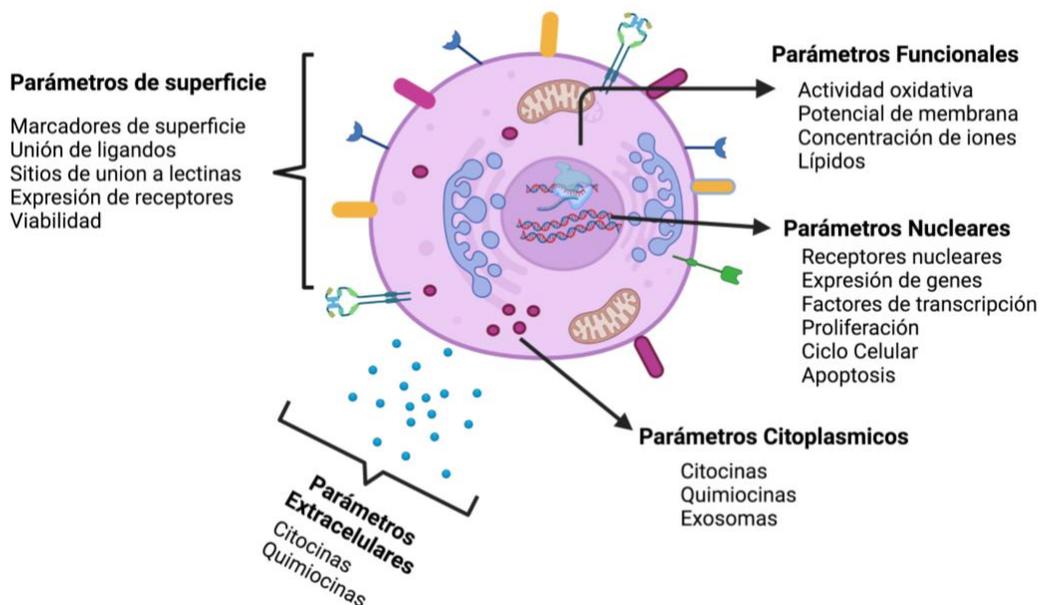


Figura 5. Aplicaciones de citometría de flujo. La figura nos describe algunas de las aplicaciones más relevantes, que se realizan por citometría de flujo.

En lo que se refiere al campo de la investigación, la citometría de flujo ha ganado presencia en diferentes áreas, como son la histología, inmunología, biología molecular, medicina genómica, microbiología, entre otras, siendo utilizada en el monitoreo de contenido de DNA, proliferación, apoptosis, expresión de fenotipos, expresión de genes reporteros, especies reactivas del oxígeno, ciclo celular, resistencia a drogas, citocinas y quimiocinas tanto intracelulares como solubles, complementando los estudios realizados con algunas otras metodologías (4).

Esta capacidad que tiene la citometría de flujo para brindarnos el análisis de una gran cantidad de células individuales para varios parámetros simultáneamente ha cambiado nuestra comprensión del comportamiento de las células y de la dinámica poblacional incluso de poblaciones clonales mostrándonos variaciones sorprendentes que se encuentran presentes en una muestra (7). Esta variación de las propiedades celulares son de gran interés a evaluar, sin embargo estas subpoblaciones tiene como limitante que se encuentran en una menor proporción, lo cual dificulta su estudio, la citometría de flujo nos proporciona la posibilidad de separar estas subpoblaciones de interés que cumplen con el fenotipo o función que se está evaluando del resto de la muestra para posteriores estudios (8). Las células que se obtienen de la separación celular cuentan con una alta viabilidad y una pureza por arriba del 94%, lo que nos permite realizar procedimientos que nos brinden resultados más

confiables y certeros. Las células obtenidas de la separación se pueden utilizar para realizar cultivo celular de poblaciones puras, ensayos de clonogenicidad, extracción de proteínas, extracción de RNA y DNA, ensayos de trasplantes, entre muchos otros más.

Algunos equipos con capacidad de realizar separación celular, además de permitirnos evaluar alguna característica biológica en las células, se clasifican como Separador de Células Individuales Activadas por Fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés *fluorescence-activated single cell sorting*), comúnmente llamados *Cell Sorters*, algunos ejemplos de estos son: BD FACSMelody, BD FACSAria III, BD FACSAria Fusion, BD FACSsymphony S6, CytoFLEX SRT, MoFlo Astrios AQ.

Preparación de la muestra

Para conseguir resultados claros y precisos es importante tener clara la pregunta biológica de investigación que se quiere responder, diseñar correctamente el panel de tinción, contar con los controles adecuados y manejar apropiadamente las muestras.

A. Diseño de un panel de tinción

Para un buen diseño del panel de anticuerpos de tinción, podemos comenzar clasificando las proteínas de interés de acuerdo al nivel de expresión

celular y su relevancia en la pregunta biológica, de esta manera podemos igualar las intensidades de fluorescencia, otorgándole al antígeno que se encuentra en menor proporción un anticuerpo conjugado con un fluoróforo más brillante y al antígeno de mayor expresión seleccionar un anticuerpo con un fluoróforo menos brillante (3). Es de suma importancia asegurarse que los fluoróforos seleccionados se pueden excitar con los laser que cuenta el citómetro a utilizar y verificar el espectro de emisión de cada uno de los fluoróforos, buscando aquellos que en el espectro de emisión se encuentren lo más alejados uno del otro, entre menos sea el traslape de los fluoróforos a usar, se garantiza una mejor resolución de la señal de fluorescencia y por lo tanto resultados confiables.

B. Controles en un experimento

Otro punto importante e indispensable es la preparación de los controles del experimento, ya que estos sirven para optimizar los ajustes de la adquisición en el citómetro, así como para la interpretación y presentación de los resultados (10).

Los controles se deben aplicar a cada uno de los experimentos que se realicen para lograr una evaluación precisa. Estos controles son:

- Control de autofluorescencia

Autofluorescencia es el término utilizado para describir la fluorescencia natural que ocurre en las células. Los compuestos comunes que dan lugar a esta fluorescencia son compuestos de anillo cíclico como NAD(P)H, colágena y riboflavina. Así como los aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina). Estos compuestos absorben en ultravioleta al rango azul (355-488 nm) y emite en el rango azul al verde (350-550 nm). La consecuencia de la autofluorescencia es la pérdida de resolución de la señal en estos rangos de luz y una disminución en la sensibilidad. Para detectar la autofluorescencia de una muestra se requiere analizar una alícuota de esta sin marcar y utilizarla como ruido de fondo, a esta muestra se le conoce como control de autofluorescencia (10).

- Control de Isotipo

Los controles de isotipo son anticuerpos conjugados que carecen de especificidad para la molécula diana y se utiliza como control negativo para estimar el nivel de fondo de tinción y la unión no específica en un experimento (11). Este control consiste en la tinción de una alícuota de la muestra

con un anticuerpo irrelevante (isotipo) que está marcado con el mismo fluoróforo.

- Controles de fluorescencia menos uno (FMO)

Los controles FMO están diseñados para identificar los efectos del traslape de espectros de otros fluorocromos en el detector de interés y nos sirve para situar la región positiva del marcador de interés (12). Un control FMO contiene todos los fluoróforos en un panel, excepto el que se está evaluando (12). Por ejemplo, en un panel de tres colores (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-APC) hay tres controles FMO por separado, uno de los controles sería el Control CD3-FMO que estaría marcado con CD4-PE y CD8-APC, con excepción de CD3-FITC; el control CD4-FMO contiene CD3-FITC y CD8-APC excepto CD4-PE y por último el control CD8-FMO marcado con CD3-FITC y CD4-PE a excepción del CD8-APC, así como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Panel de 3 colores y control de fluorescencia menos uno (FMO). Se muestra un panel de 3 colores con sus respectivos controles FMO, donde cada control contiene el panel de marcaje excepto el que se esta midiendo.

Antígeno	FITC	PE	APC
CD3 FMO	—	CD4	CD8
CD4 FMO	CD3	—	CD8
CD8 FMO	CD3	CD4	—

- Controles de Compensación

Uno de los controles más importantes en citometría de flujo es la compensación. Es un proceso utilizado para corregir el traslape del espectro de emisión entre los fluoróforos a utilizar. Si este efecto no se corrige la fluorescencia de emisión de un fluoróforo, hace una contribución de señal al PMT correspondiente a un fluoróforo con un espectro de emisión adyacente.

La compensación es el proceso matemático por el cual se elimina la superposición entre fluorocromos causado por la física de la fluorescencia (13).

Los controles de compensación deben de cumplir con las siguientes características:

- Cada control de compensación debe ser tan brillante como las muestras a las que se aplicarán.

- La autofluorescencia debe ser la misma para las poblaciones negativa y positiva usadas para el cálculo de la compensación en cada detector.
- El fluorocromo usado para el control de compensación debe ser exactamente el mismo que el que se usará en la muestra experimental.

C. Manejo adecuado de la muestra

Tenemos que tener en cuenta que las muestras mal preparadas proporcionarán resultados deficientes y generarán un aumento en la autofluorescencia y por lo tanto aumentarán el ruido de fondo. Una característica importante de la preparación de muestras para citometría de flujo, es la obtención de una suspensión de células individuales con pocos agregados celulares. Las células que crecen adheridas a una placa de cultivo deben separarse de la placa, generalmente se realiza por un proceso enzimático, un ejemplo de estas son la pepsina y la tripsina (5,14).

Es importante tratar bien las células durante el proceso de preparación de la suspensión celular evitando los procesos de agitación mediante vortex donde las células se dañan.

Durante la tinción de antígenos de superficie, las células deben estar preferiblemente en hielo (siempre que el experimento lo permita) para disminuir el recambio de las proteínas membranales. Las células pueden usarse frescas (no fijadas) para incubarse con anticuerpos acoplados a un fluoróforo, en algunos casos las células se fijan después de ser marcadas para un antígeno de superficie, especialmente si también se va a teñir un antígeno intracelular (5,14).

Para los antígenos citoplasmáticos o nucleares, las células deben fijarse y permeabilizarse para que el anticuerpo acceda al antígeno.

Algunas de las sustancias más usadas para permeabilizar es el Triton X-100, saponina y NP40, y entre los agentes usados para fijar se encuentra el formaldehído, paraformaldehído y etanol.

Para reducir la formación de agregados, hecho que podría bloquear el flujo celular, hay que evitar utilizar una densidad alta de células por muestra. La adición de un agente quelante como el EDTA puede ser de ayuda a la hora de reducir el número de agregados.

Verificar que la viabilidad celular sea mayor del 90%, ya que la presencia de células muertas puede producir falsos positivos debido a la autofluorescencia que generan (14).

Al momento de realizar el marcaje se recomienda usar albúmina de suero bovino que nos ayudará a reducir las uniones inespecíficas de los anticuerpos debido a la interacción directa proteína-proteína que puede provocar la aparición de falsos positivos.

Adquisición de la muestra

Para realizar la adquisición de la muestra es importante contar con los controles apropiados, anteriormente citados, para crear una plantilla adecuada de análisis, con los ajustes necesarios en los detectores a usar, que nos permitan distinguir la población de interés, así como realizar una correcta compensación. En la figura 6 se muestra de manera general, los detectores en los cuales se tienen que realizar los ajustes de voltaje, así como el flujo para optimizar las propiedades del citómetro.

Un punto a tomar en cuenta en la adquisición de las muestras, es que no se puede cambiar los ajustes del citómetro en medio de la adquisición ya que esto impide la correcta comparación con los controles y por lo tanto lleva a errores en la interpretación de los resultados.

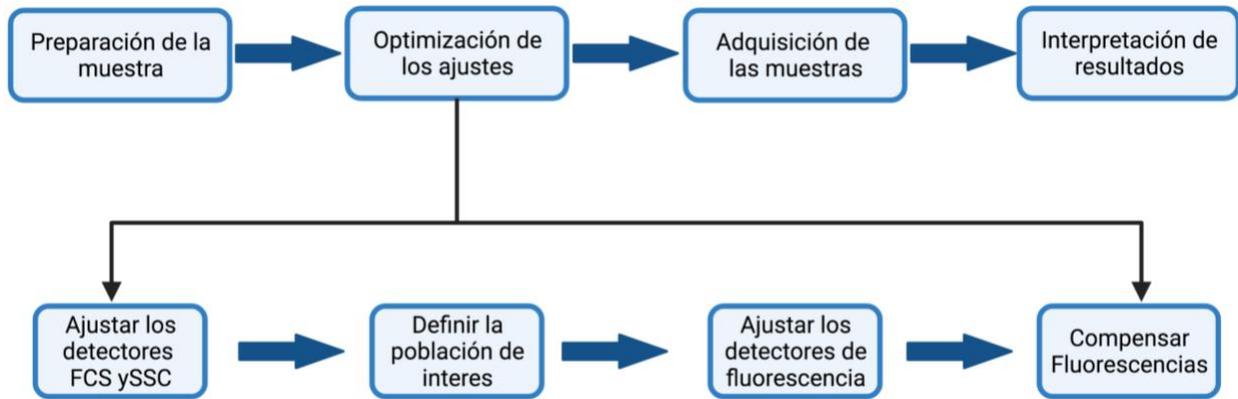


Figura 6. Adquisición de la muestra. El diagrama nos muestra el flujo de trabajo para la adquisición de la muestra, así como la realización de los ajustes adecuados en los detectores a usar, para la correcta compensación.

Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos pueden ser representados mediante diferentes estilos, desde una gráfica de puntos hasta una figura tridimensional; la clave se centra en seleccionar los gráficos que reflejen los resultados con precisión y sin generar confusiones.

A continuación se describen las representaciones más utilizadas en esta área:

Gráfico de puntos: Este gráfico muestra la relación entre dos marcadores diferentes y muestra a cada punto como un evento (se define como evento a cualquier partícula que haya sido excitada por el láser). El desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica la expresión de un marcador X, mientras que el desplazamiento de los puntos hacia arriba, muestra la expresión de un marcador (15) (Figura 7).

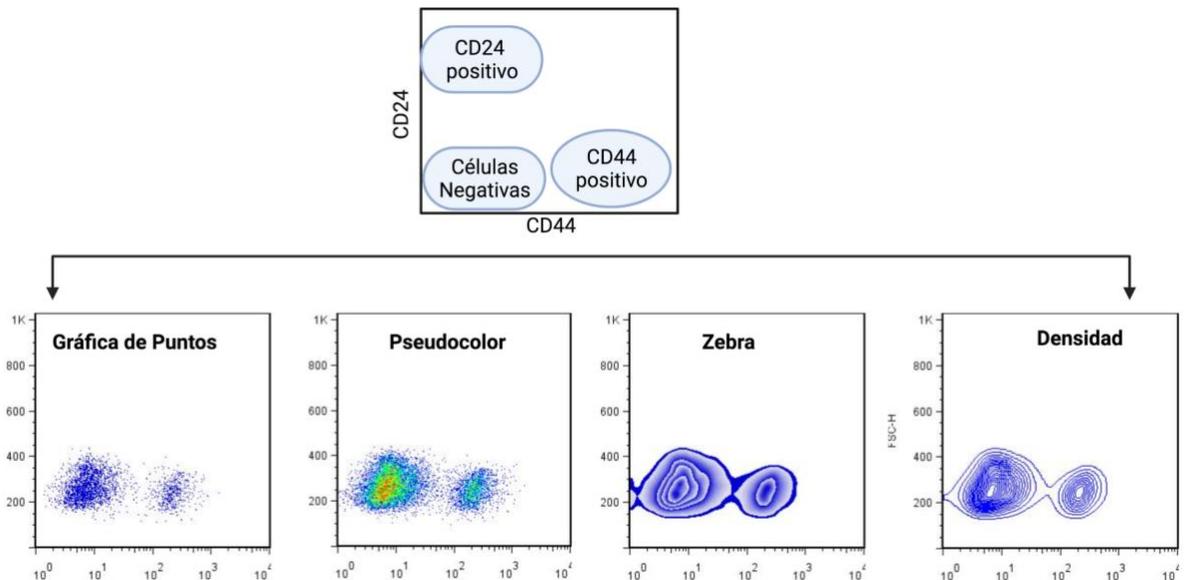


Figura 7. Tipos de gráficas. La figura representa una población de células marcadas con anticuerpos CD44, CD24 y su representación en los diferentes tipos de gráficas usadas en citometría de flujo: gráfica de puntos, pseudocolor, zebra y densidad.

Gráficos de densidad: Estos gráficos muestran dos parámetros de medición, uno en el eje X y otro en el eje Y, y la intensidad de fluorescencia de los eventos como un gráfico de densidad (o punto) las poblaciones con mayor número de eventos se representan mediante una escala de tonos en gris (gráfico de zebra), mediante colores cercanos al naranja (gráfico pseudocolor), o mediante líneas (gráfico de contornos) (15) (Figura 7).

Histogramas: Los histogramas muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas (15) (Figura 8).

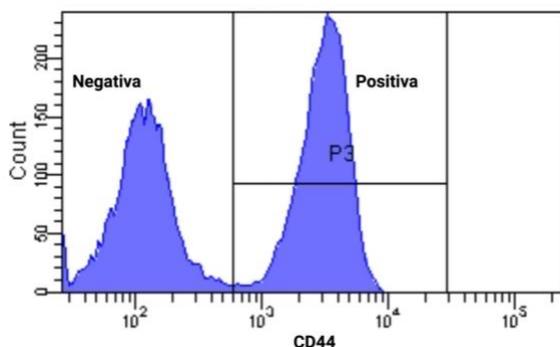


Figura 8. Histograma. En el histograma se muestran dos picos, la población de células positivas al marcador CD44 que esta representada por el pico de la derecha, mientras que el pico de la izquierda muestra la población negativa para el marcador.

Referencias

1. Aysun Adan, Günel Alizada, Yağmur Kiraz, Yusuf Baran and Ayten Nalbant (2017). Flow cytometry: basic principles and applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:2, 163-176
2. Dean P.N. y Hoffman.R.A. (2007). Overview of flow cytometry instrumentation. *Current Protocols in Cytometry*. Wiley-Liss Publication
3. Tim Bushnell, Ph.D, The Fluorochrome Less Excited: How To Build A Flow Cytometry Antibody Panel. (<https://expert.cheekyscientist.com>)
4. Lourdes María Barrera Ramírez, Ma. Elisa Drago Serrano, Julia Pérez Ramos, Ana Cecilia Zamora, Fabiola Gómez Arroyo, Teresita del Rosario Sainz Espuñe, Felipe Mendoza Pérez. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias*. 17, 42-55
5. Ormerod M.G. 2008. *Flow Cytometry: A Basic Introduction*. De Novo, EUA. 116 pp. (<http://flowbook.denovosoftware.com/>)
6. Hoffman R.A. 2008. Flow cytometry: instrumentation, applications, future trends and limitations. *Springer Ser Fluoresc*, 6: 307-342
7. Diethard Mattanovich and Nicole Borth. (2006). Applications of cell sorting in biotechnology. *Microbial Cell Factories*. 5,12
8. Sherrif F. Ibrahim, Ger van den Engh. (2007) *Flow Cytometry and Cell Sorting*. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 106, 19-39
9. Tim Bushnell, Ph.D. and Expert Cytometry LLC. (2015) *MODERN FLOW CYTOMETRY*. Expertcytometry.com
10. Holden T. Maecker and Joseph Trotter. (2006) *Flow Cytometry Controls, Instrument Setup, and the Determination of Positivity*. *Cytometry, Part A* 69⁹,1037-1042
11. Tim Bushnell, Ph.D, *Experimental Controls For Reproducible Flow Cytometry Measurements*. (<https://expert.cheekyscientist.com>)
12. Ruud Hulsphas, Maurice R.G. O’Gorman, Brent L. Wood, Jan W. Gratama, and D. Robert Sutherland.(2009) *Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry*. *Cytometry, Part B* 76B, 355-364
13. Tim Bushnell, PhD and Michael Kissner, BA. (2018) *Advanced Topics in 4-10 color Compensation for Flow Cytometry*. Expertcytometry.com
14. McCarthy D.A. 2010. Cell Preparation. En: *Flow cytometry: principles and applications*. 3a ed., 2a reimpression. Macey M.G. (editora). New Jersey, EUA, editorial Human Press. 17-58 pp
15. Pérez Lara Jocelyn Carolina, Santiago Cruz Wendolaine, Romero Ramírez Héctor, Rodríguez-Alba, Juan Carlos.(2018) *Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica*. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*.18, 41-52



**M. en C. LINDA NELLY PATIÑO
URIOSTEGUI
ORCID: 0000-0003-3293-2294**

Químico Biólogo Parasitólogo por la Universidad Autónoma de Guerrero. Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular por el Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Responsable de la Unidad de Citometría de Flujo (UCiF) del Instituto Nacional de Medicina Genómica desde el 2010.

Investigadora en Ciencias Médicas desde 2010. Miembro del Capítulo de Citometría de Flujo de la Sociedad Mexicana de Inmunología. Talleres Impartidos: Análisis de DNA: Ciclo Celular. Separación Celular, Aplicaciones de Citometría, Curso básico para usuarios de Citometría, Principios básicos de análisis de datos.