



XVII encuentro  
Participación de la  
Mujer  
en la Ciencia



## **Análisis de respuesta de superficie para optimizar la preparación de muestras de origen hematopoyético destinadas al análisis por citometría de flujo**

Jéssica Aneth Vergara Hernández<sup>1</sup>, Abelardo Daniel Vergara Hernández<sup>2</sup>, Marco Aurelio Pardo Galván<sup>1</sup>, Misael Herrejón Carmona<sup>3</sup> y Ana Edith Higareda Mendoza<sup>1</sup>

1 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2 Instituto Tecnológico de Toluca, 3 Hospital Infantil de Morelia. anilude20@gmail.com

El análisis de células de origen hematopoyético es de gran utilidad en el diagnóstico y en el seguimiento del tratamiento de varias enfermedades como anemia, VIH, leucemia, diversas infecciones, entre otras. Existen diversas técnicas de análisis para este tipo de muestras, entre las cuales encontramos a la citometría de flujo (CF). La CF se perfila como una de las técnicas más importantes para muestras en suspensión como las de origen hematopoyético, esto debido a que permite realizar y describir de manera multiparamétrica a las diferentes subpoblaciones de la muestra, junto con el análisis simultáneo, principalmente, de marcadores o antígenos de superficie, adquiriendo miles de eventos por segundo. Sin embargo, con la descripción de nuevos marcadores intracelulares es necesario que estos protocolos sean modificados para incluir la detección de éstos, ya que requieren incluir el proceso de permeabilización celular para poder detectar las señales intracelulares. Considerando que existen factores que pueden causar variaciones o interferencias en los resultados de un análisis multiparamétrico de CF, el objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo por medio de un análisis de respuesta de superficie (ARS) para minimizar la pérdida celular y evitar la modificación artificial de las señales de fluorescencia en la CF. En base a la experiencia de experimentación y a lo reportado en la bibliografía se identificaron todas aquellas variables que pudieran interferir en el análisis por CF de muestras hemáticas y todos los factores que pudieran interferir en cada una de estas variables. Se generó una matriz de variables y factores para el ARS con el programa Minitab. De acuerdo a los resultados del ARS, las variables experimentales más influyentes, en orden descendente, son: fuerza centrífuga; número de lavados; tiempo de permeabilización; tiempo, temperatura y volumen de fijación; tiempo, temperatura, forma del tubo y volumen de la solución de lisis eritrocitaria. Con los parámetros óptimos obtenidos se estableció un protocolo final, mismo que fue probado con muestras hemáticas. Se obtuvieron todas las subpoblaciones leucocitarias descritas clásicamente para un análisis de CF, las cuales fueron comprobadas por medio de la expresión de CD45. Se determinó que la fuerza centrífuga debe ser de 5 minutos a 500xg y se debe realizar un lavado tras cada paso, a excepción del proceso de permeabilización en el cual se recomiendan dos lavados. Asimismo, la mayor eficiencia de lisis se obtuvo en un tubo de 4 mL con fondo redondo con una relación muestra:buffer de lisis eritrocitaria de 1:14, incubando a TA durante 15 minutos. La fijación celular con paraformaldehído debe ser a TA durante 15 minutos en un volumen final de 500µL, seguida de la permeabilización a TA durante 10 minutos con 0.2% de Tritón. En conclusión, el ARS nos permitió optimizar la metodología de análisis de muestras hemáticas por CF al modelar y analizar los problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras, siendo de mayor impacto las variables temperatura, tiempos de incubación y número de lavados durante las etapas de lisis eritrocitaria, fijación y permeabilización celular.