

# Checklist de Citometría de Flujo

Creado por Nabil Subhi-Issa, PhD - [lacolmenamolecular.com](http://lacolmenamolecular.com)

# 1. Preparación de la muestra

## ◆ Introducción

La calidad de los datos en citometría depende en gran medida de cómo se manipulan y preparan las muestras antes de llegar al citómetro. Una muestra bien procesada reduce artefactos, mejora la resolución de poblaciones y evita perder información crítica. En esta sección se revisan los pasos esenciales para asegurar que las células que analizamos son representativas y fiables.

### Viabilidad celular

- Usar un tinte de viabilidad (ej. 7-AAD, Zombie, Live/Dead).
- Incluir control negativo sin tinte.
- Mantener células en hielo hasta la adquisición para minimizar apoptosis.

1

La viabilidad es un factor crítico: una muestra con <70% de células vivas genera datos poco fiables, ya que las células muertas tienen permeabilidad aumentada y pueden fijar anticuerpos de forma inespecífica, creando falsos positivos. Además, la muerte celular suele liberar restos celulares y DNA que favorecen la formación de agregados, lo que altera la dispersión lateral (SSC) y el gating. El uso de colorantes de viabilidad permite excluir estas células y garantizar que los análisis reflejen poblaciones funcionales reales.

### Controles y condiciones previas

- Asegurar que las células están libres de agregados (filtrado con malla 40 µm).
- Evitar exceso de glóbulos rojos (usar lisis si procede).
- Ajustar concentración celular adecuada (ej. 1–5 x 10<sup>6</sup> células/ml).

2

Los agregados celulares distorsionan la señal de forward y side scatter, impidiendo separar correctamente poblaciones. La presencia de glóbulos rojos puede enmascarar linfocitos minoritarios y afectar la calidad del staining. Por otro lado, una concentración demasiado baja reduce la frecuencia de eventos y alarga la adquisición, mientras que una concentración demasiado alta incrementa la coincidencia de eventos. Mantener condiciones estándar es clave para obtener datos reproducibles y comparables entre experimentos.

### Manipulación y almacenamiento

- Procesar las muestras lo antes posible tras la extracción.
- Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación.
- Documentar el tiempo desde la extracción hasta el análisis.

3

Las células son sistemas dinámicos y, fuera del organismo, cambian rápidamente. Un retraso en el procesamiento puede provocar apoptosis o activación inespecífica de linfocitos, alterando la expresión de marcadores de superficie (ej. CD69, HLA-DR<sup>+</sup>).

## Bloqueo y reducción de background

- Usar Fc-block si se trabaja con PBMCs humanos o tejidos con muchas células mieloides.
- Considerar incubación con suero homólogo o BSA para reducir uniones inespecíficas.

4

Los receptores Fc en células mieloides y NK pueden unirse inespecíficamente a las regiones Fc de los anticuerpos, generando señal de fondo y artefactos en el gating. El uso de Fc-block reduce este efecto y mejora la resolución de las poblaciones de interés.

# 2. Panel de anticuerpos

## ♦ Introducción

El diseño del panel de anticuerpos es uno de los pasos más críticos en citometría multiparamétrica. Una buena selección de fluorocromos y clones garantiza que los marcadores se detecten de forma clara y sin interferencias, mientras que un panel mal equilibrado genera solapamientos, pérdida de resolución y resultados difíciles de interpretar. Esta sección resume los aspectos clave que deben comprobarse antes de llevar un panel a la práctica.

## Selección de clones

- Verificar que los clones elegidos son validados para citometría de flujo.
- Priorizar clones con buena relación señal/ruido en la literatura o fichas técnicas.
- Confirmar la reactividad específica en la especie de estudio (ej. humano, ratón).

1

No todos los clones de anticuerpos tienen la misma afinidad o especificidad. Elegir clones validados y usados en la literatura evita falsos negativos o resultados difíciles de reproducir. Un clon con baja afinidad puede subestimar la frecuencia de una población, mientras que uno con cross-reactividad puede introducir señal de fondo. Validar previamente asegura consistencia y comparabilidad con otros estudios.

## Elección de fluorocromos

- Asignar fluorocromos brillantes (FITC, PE...) a marcadores de baja expresión.
- Usar fluorocromos menos brillantes para marcadores abundantes.
- Evitar redundancias innecesarias (dos marcadores altamente correlacionados con fluorocromos brillantes).

2

La intensidad relativa de los fluorocromos afecta directamente la detección. Si un marcador poco abundante se asigna a un fluorocromo débil, puede quedar enmascarado por el background. Por el contrario, un marcador muy abundante con un fluorocromo brillante puede saturar la señal. Optimizar el emparejamiento asegura que cada población se detecte con la máxima resolución posible.

## Controles de fluorescencia

- Incluir controles FMO (Fluorescence Minus One) para marcadores difíciles de discriminar.
- Usar controles de isotipo solo cuando haya dudas de especificidad.
- Preparar controles de compensación individuales para cada fluorocromo.

3

Los FMOs son esenciales en paneles complejos: permiten establecer los límites de gating de un marcador en presencia de todos los demás, pero sin ese canal concreto. Esto es clave para poblaciones con expresión tenue o heterogénea. Los controles de isotipo, aunque menos utilizados hoy, pueden ayudar en casos de sospecha de unión inespecífica. Los controles de compensación individuales son imprescindibles para corregir el solapamiento espectral entre fluorocromos.

## Spillover y espectro

- Revisar la matriz de spillover teórica antes de diseñar el panel.
- Evitar combinar fluorocromos con solapamiento excesivo en marcadores coexpresados.
- Considerar el uso de software de diseño de panel (ej. FluoroFinder, Cytobank).

4

Cada fluorocromo emite luz en un rango espectral, y cuando dos están demasiado solapados se produce “spillover”, que incrementa el ruido y dificulta el gating. Esto es especialmente problemático cuando los dos marcadores están presentes en la misma célula, ya que la compensación matemática no siempre corrige por completo la interferencia. Revisar la matriz espectral y apoyarse en herramientas de diseño permite anticipar estos problemas y minimizar errores experimentales.

## Titulación y validación del panel

- Titular cada anticuerpo para determinar la concentración óptima.
- Validar el panel completo en una muestra de prueba antes de usarlo en pacientes o cohortes.
- Documentar diluciones y lotes para garantizar reproducibilidad.

5

Usar una concentración estándar de anticuerpo puede ser ineficiente: demasiado poco produce señal débil y demasiado provoca saturación y mayor background. La titulación asegura la mejor relación señal/ruido para cada clon. Validar el panel en una muestra control permite identificar problemas de spillover, gating o expresión inesperada antes de analizar cohortes valiosas. Documentar los detalles técnicos es esencial para repetir el experimento y para la transparencia en publicaciones.

# 3. Configuración del citómetro

## ◆ Introducción

Un citómetro mal configurado puede arruinar un experimento incluso si la preparación de la muestra y el panel de anticuerpos son impecables. La calibración y el ajuste de parámetros aseguran que la señal que detectamos corresponde fielmente a la fluorescencia emitida, evitando sesgos y artefactos. Esta sección cubre los pasos esenciales para que el instrumento esté en condiciones óptimas antes de adquirir datos.

1

### Calibración y control diario

- Utilizar las "beads" de calibración o control de calidad antes de iniciar.
- Revisar que los valores de fluorescencia estén dentro del rango esperado.

2

### Ajuste de voltajes (PMT)

- Configurar los voltajes de cada canal en base a controles de células no teñidas.
- Evitar que las poblaciones se "aplasten" en el eje (muy bajo) o se saturen (muy alto).
- Mantener voltajes consistentes entre experimentos para comparabilidad.

3

### Compensación

- Preparar controles de compensación con un único fluorocromo positivo por tubo.
- Aplicar la matriz de compensación al inicio y revisarla en cada experimento.
- Validar que los canales compensados no muestran sesgo (poblaciones centradas).

El rendimiento de los láseres, detectores y fluidos del citómetro varía con el tiempo. Las "beads" de calibración permiten comprobar la alineación óptica y la sensibilidad de los detectores. Si los valores se desvían, los resultados entre días no son comparables. Documentar cada control crea un historial de calidad que permite identificar problemas técnicos a tiempo.

**Importante:** Los voltajes determinan la amplificación de la señal. Un voltaje demasiado bajo hace que poblaciones positivas se solapen con las negativas, mientras que uno demasiado alto genera artefactos y reduce la resolución. Ajustarlos correctamente con muestras no teñidas y mantenerlos estables entre ensayos garantiza consistencia y evita errores de interpretación.

En citometría multiparamétrica, los espectros de emisión se solapan inevitablemente. La compensación corrige matemáticamente este solapamiento. Si no se realiza, los datos muestran falsos positivos en canales adyacentes. Una mala compensación puede desplazar poblaciones enteras y dar conclusiones erróneas. Revisar y ajustar la matriz en cada sesión es indispensable.

5

## Umbral (threshold) y velocidad de adquisición

- Definir un umbral en FSC o SSC para excluir restos celulares y ruido.
- Mantener una velocidad de adquisición moderada para evitar coincidencia de eventos.
- Documentar el número total de eventos adquiridos y descartados.

6

## Limpieza y mantenimiento

- Pasar soluciones de limpieza y agua destilada al inicio y final de cada sesión.
- Revisar que no haya burbujas en el sistema fluidico.

El umbral evita que partículas pequeñas o restos aparezcan como falsos eventos. La adquisición demasiado rápida genera dobletes (dos células detectadas como una), alterando frecuencias poblacionales.

Los residuos de fluorocromos, sales o proteínas pueden acumularse en el sistema fluidico, generando bloqueos, ruido de fondo o incluso contaminación entre muestras. La limpieza previene estos problemas y prolonga la vida útil del instrumento. Detectar burbujas y cumplir el mantenimiento preventivo evita fallos inesperados en experimentos críticos.

## 4. Estrategia de gating inicial

### ♦ Introducción

El gating es el proceso que convierte millones de puntos en poblaciones celulares significativas. Una estrategia mal planteada puede excluir células relevantes, incluir artefactos o distorsionar proporciones. El gating inicial es especialmente crítico: define la base sobre la que se construyen todos los análisis posteriores. Aquí se resumen los pasos esenciales para comenzar con un gating robusto, reproducible y transparente.



### Exclusión de agreados y debris

- Definir un gate en FSC-A vs SSC-A para excluir restos celulares.
- Usar FSC-H vs FSC-A (o área vs altura) para eliminar dobles y agregados.



### Selección de poblaciones

- Gate FSC/SSC para aislar la región de linfocitos (u otra población primaria).
- Ajustar los límites con controles para evitar excluir subpoblaciones atípicas.



### Control de viabilidad

- Aplicar el gate en el canal de viabilidad (ej. 7-AAD, Zombie).
- Excluir las células positivas para marcador viabilidad.

 Los restos celulares generan ruido que puede confundirse con células pequeñas (ej. linfocitos). Los agregados celulares aparecen como eventos "más grandes", distorsionando la frecuencia de poblaciones. Al excluir detritos y dobles desde el inicio, se asegura que el análisis posterior se basa únicamente en células viables y singulares.



## Ajuste de gates

- Revisar FMOs en cada marcador crítico antes de fijar límites.
- Ajustar los gates en base a controles de fluorescencia, no a "ojímetro".

## Transparencia y reproducibilidad

- Guardar las plantillas de gating en el software (FlowJo, Kaluza, Cytobank).
- Documentar criterios de exclusión/inclusión.
- Aplicar la misma plantilla a todas las muestras de un experimento.

Los FMOs muestran cómo se comporta cada canal en ausencia de un marcador específico. Esto es fundamental para decidir dónde colocar el límite entre negativo y positivo en marcadores de baja expresión. Sin este control, el gating puede volverse arbitrario y difícil de reproducir.

El gating manual es susceptible a variaciones subjetivas entre operadores o días distintos. Guardar y aplicar plantillas estandarizadas asegura consistencia. Documentar los criterios añade transparencia y permite que otros reproduzcan el análisis. En proyectos clínicos, esto es esencial para validación y cumplimiento regulatorio.

## 5. Exportación y almacenamiento de datos

### ◆ Introducción

Los datos de citometría son un recurso valioso que a veces se pierde o queda inaccesible por una mala gestión. La exportación y el almacenamiento adecuados garantizan que los análisis puedan revisarse, compartirse y reutilizarse en el futuro. Además, en contextos clínicos o colaborativos, un registro ordenado y seguro de los archivos es tan importante como el experimento mismo.



## Exportación de archivos FCS

- Guardar todos los archivos crudos (.FCS) sin modificaciones.
- Exportar cada muestra con un identificador único y consistente.
- Mantener la versión del software y del citómetro registrada.

## Organización de metadatos

- Incluir información de muestra: tipo de tejido, condiciones de cultivo, tratamiento.
- Documentar fecha, hora y operador de la adquisición.
- Asociar controles (FMOs, isotipos, beads de compensación) a las muestras correspondientes.

El archivo FCS es el estándar universal para citometría y permite que los datos se analicen en cualquier software. Guardar siempre la versión cruda asegura que se pueda volver al dataset original si algo falla en el análisis posterior. El uso de identificadores únicos (ej. paciente001\_día0) evita confusiones en cohortes grandes. Registrar software e instrumento es clave para reproducibilidad y trazabilidad.

**Punto crítico:** Los metadatos contextualizan los datos crudos y permiten interpretar correctamente los resultados. Sin ellos, es imposible saber si una diferencia entre muestras es biológica o técnica. Documentar los controles vinculados a cada lote de muestras es esencial para poder repetir el análisis en condiciones comparables.



## Copias de seguridad

- Almacenar los datos en al menos dos ubicaciones distintas (ej. servidor institucional + nube).
- Usar carpetas organizadas por proyecto, fecha y tipo de muestra.
- Asegurar medidas de protección de datos en estudios clínicos (cumplir GDPR/LOPD).

## Exportación de resultados procesados

- Guardar estadísticas clave (frecuencias, medianas de fluorescencia) en formato tabular (CSV/Excel).
- Exportar gráficos representativos en alta calidad para informes o publicaciones.
- Registrar la versión de la plantilla de gating utilizada.

Los datos de citometría son difíciles y costosos de obtener, pero pueden perderse en segundos por un fallo de hardware. Mantener copias de seguridad en diferentes soportes garantiza la preservación de la información. La organización en carpetas claras evita confusiones y pérdida de tiempo. En el caso de datos clínicos, el cumplimiento de la normativa de protección de datos es obligatorio y evita sanciones legales.

Los análisis procesados (frecuencias de poblaciones, intensidades medias) son los que finalmente se interpretan y publican. Exportarlos en formato tabular permite analizarlos posteriormente con software estadístico (R, GraphPad, SPSS). Guardar gráficos facilita la comunicación y comparación visual. Asociar resultados con la plantilla de gating asegura trazabilidad: cualquier cambio en la estrategia de gating puede influir en los resultados exportados.

¿Ya has aplicado esta checklist?

El siguiente paso es analizar tus datos correctamente.

Descarga mi **Script en R para análisis estadístico en biomedicina**, con tests automáticos según la naturaleza de tus datos.

Accede aquí:

[www.lacolmenamolecular.com/recursos](http://www.lacolmenamolecular.com/recursos)