

## MANUAL DE FLOWING PARA MICROAULA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

**Al finalizar la actividad el alumno debe ser capaz de:**

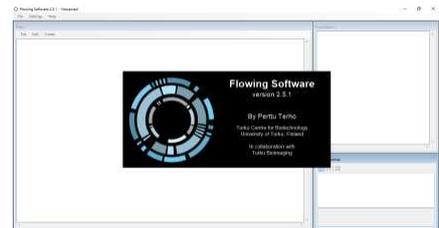
- Representar células en dot plots e histogramas.
- Seleccionar células por sus propiedades morfológicas mediante regiones.
- Establecer correctamente marcadores de umbral de fluorescencia.
- Analizar múltiples fluorescencias sobre las células de interés.
- Superponer histogramas y combinar regiones.
- Interpretar los resultados de la función Estadística.

En esta práctica se analizarán datos obtenidos por citometría de flujo a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos y con distintas patologías que afectan al Sistema Inmunitario. Se utilizará el programa *Flowing* (v. 2.5.1), software libre creado por **Perttu Terho de la Universidad de Turku, Finlandia**, y que permite analizar datos de la mayoría de los citómetros de flujo en un ordenador personal. Para utilizarlo por su cuenta, tiene dos opciones:

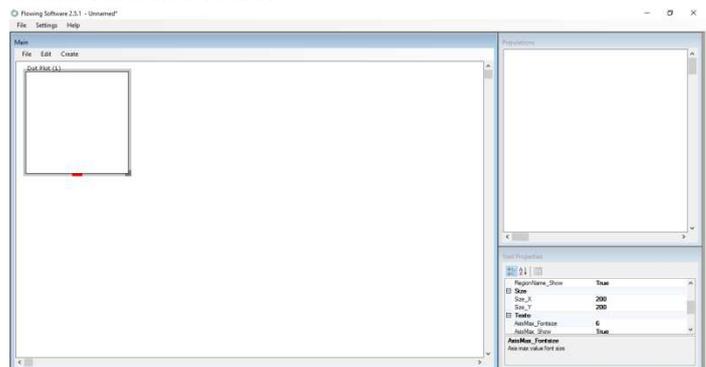
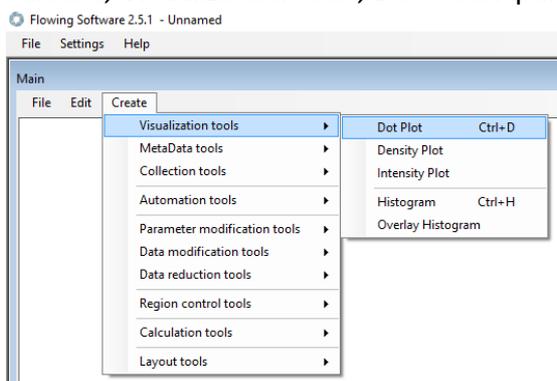
- a) Acceder a la versión instalada en las ALAS Merla (Aulario General), Marabú y Mirasol (Facultad de Medicina).
- b) Descargarlo en su ordenador de <http://www.flowingsoftware.com/> o de <http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/> (aquí también encontrará un video tutorial).

En cualquiera de los casos, necesitará dos archivos de datos en formato FCS (*Flow Cytometry Standard*) que debe descargar de: <http://hdl.handle.net/10201/51948> se llaman 20110201.001 y 20110201.002. Clique sobre cada uno de ellos y guárdelos como tal en una carpeta.

- 1) Inicie el programa. Si está en un ALA: Introduzca la tarjeta inteligente y pulse *Inicio, Equipo, Prácticas (\\hermes..) (P:), Flowing 2.5.1, icono Flowing Software.exe*. Si el programa está instalado en un ordenador personal pulse en el icono del programa. En cualquiera de los casos se abrirá la pantalla de la derecha. Cierre la ventana de News Channel.



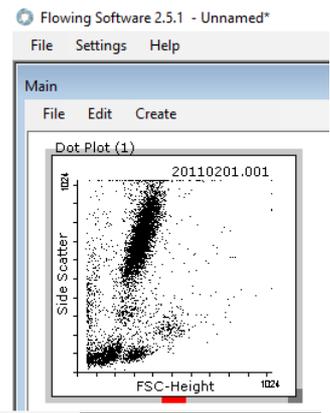
- 2) Representación mediante dot plot. En la ventana más grande, denominada *Main*, seleccione *Create, Visualization tools, Dot Plot*. Aparecerá una ventana vacía:



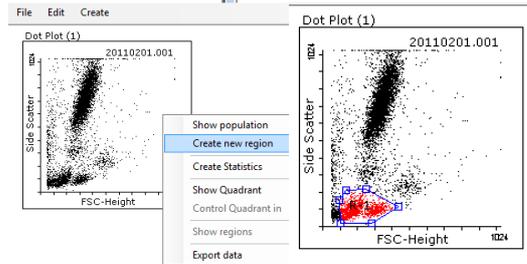
3) Abra ahora el archivo de datos a analizar: *File, Open FCS* y seleccione 20110201.001 que ha descargado antes del aula virtual y pulsar Abrir.

Por defecto, representará los parámetros *FSC-Height (tamaño) vs Side Scatter (granularidad)*. Recuerde que cada uno de los puntos de este dot plot representa una célula.

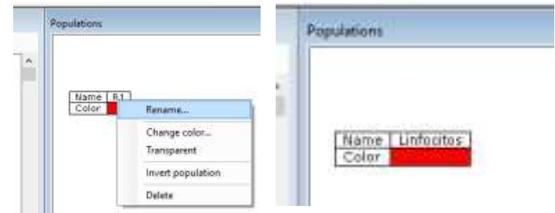
Abajo a la derecha de su pantalla verá el recuadro *Tool Properties* que le permitirá cambiar algunas propiedades visuales de esta ventana o de la que en su momento tenga seleccionada.



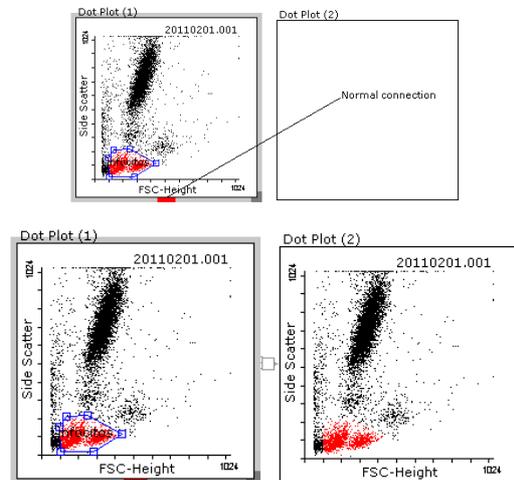
4) Para seleccionar las células de interés (en primera instancia linfocitos): pulse con el botón secundario sobre el dot plot y seleccione *Create new region*. Ahora clique con el botón principal sobre el dot plot y "pinte" con clics y trazos un polígono (región) que englobe los linfocitos y que debe terminar clicando en el punto inicial. Verá que por defecto llama a esta región R-1 y pinta de rojo las células que contiene. Puede retocar la región clicando y moviendo en los cuadrados azules.



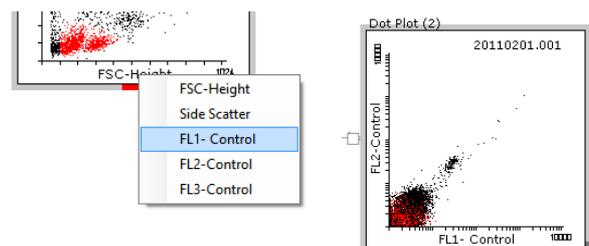
5) Si necesita **borrar la región** y hacerla de nuevo, o para **cambiar el color o el nombre**, utilice la ventana *Populations* a la derecha de su pantalla y el botón secundario del ratón. En este caso cambiaremos "R-1" por "Linfocitos".



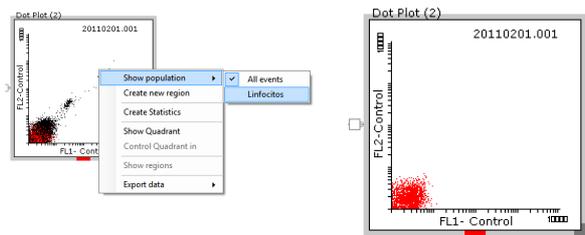
6) Cree un segundo dot plot como en el paso 2 y mueva la ventana vacía a la derecha del primero. Ahora conéctelos, para ello seleccione con el botón principal el primer dot plot (aparece rodeado por un marco gris) y sitúe el puntero sobre el segmento rojo inferior. Trace con el botón principal una línea hasta el dot plot de la derecha. De este modo está **sincronizando ambas ventanas** y bastará hacer un cambio en la principal (el dot plot origen del conector o denominado *dot plot master*) para que se transmita al secundario (denominado *servant*). Más adelante verá su utilidad.



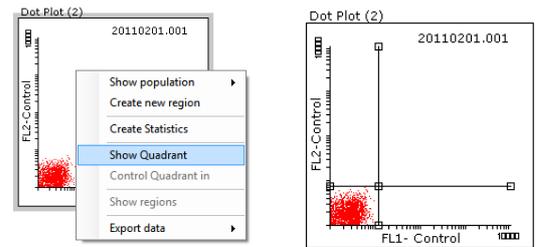
7) El nuevo dot plot muestra *FSC vs Side Scatter* por defecto. Cambie estos parámetros clicando sobre cada uno de ellos con el botón secundario y seleccione *FL1 vs FL2*. Fíjese que los linfocitos siguen apareciendo de rojo.



8) Para que en el dot plot de la derecha aparezcan únicamente linfocitos, coloque el cursor encima y pulse con el botón secundario, seleccione *Show population, Linfocitos*. Observe que esta primera muestra 20110201.001 tiene muy baja fluorescencia ya que corresponde al control que se utiliza para establecer el fondo del ensayo (autofluorescencia sumada a la unión inespecífica de los Ac fluorescentes).

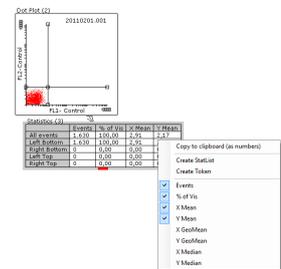


9) Para colocar los cuadrantes: clique sobre el dot plot con el secundario y seleccione *Show Quadrant*. Clicando en el punto de cruce y moviendo puede ajustarlos para delimitar bien el fondo, dejando todas o la mayoría de las células en el cuadrante inferior izquierdo, como se muestra a la derecha.

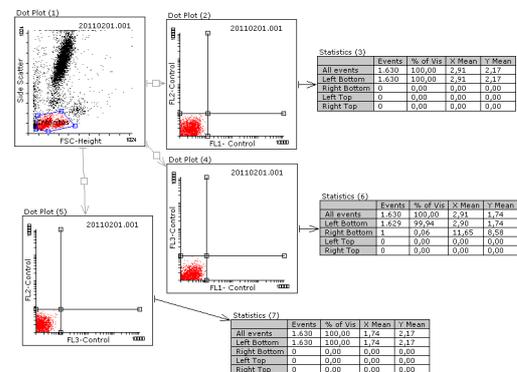


10) Determine cuántas células hay en cada cuadrante mediante la función Estadística: pulse sobre el dot plot con el secundario y seleccione *Create Statistics*.

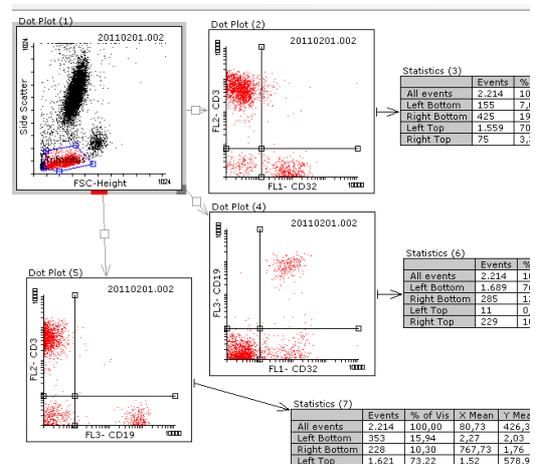
Para eliminar información innecesaria de la tabla de datos clique sobre ella y deje únicamente las cuatro primeras opciones. Fíjese que ahora cualquier cambio que haga en el dot plot principal, p.ej. modificar la forma de la región, se verá en el segundo y en la estadística.



11) Cree ahora otros dos dot plots y conéctelos al primero. Seleccione los parámetros *FL1 vs FL3* en uno y *FL3 vs FL2* en otro. Muestre linfocitos en ambos casos y ponga cuadrantes y estadística. De esta manera, con un golpe de vista, podrá ver los linfocitos con las tres combinaciones posibles de FL1, FL2 y FL3.

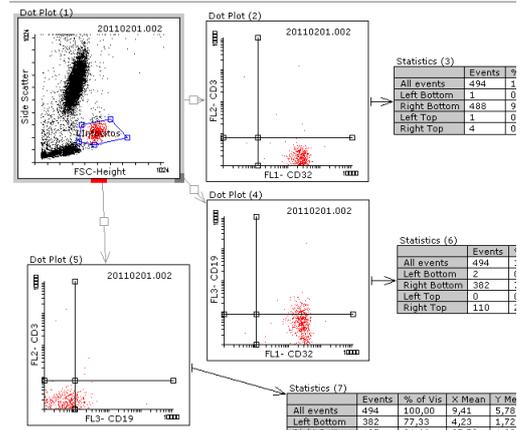


12) Ahora analice el fichero 20110201.002, para ello seleccione con un clic el dot plot principal y pulse *File, Next file in directory*. Aparecerán representados todos los parámetros de este fichero, con sus respectivas estadísticas, tal y como se muestra a la derecha. Repitiendo esta sencilla operación puede analizar múltiples ficheros de datos.



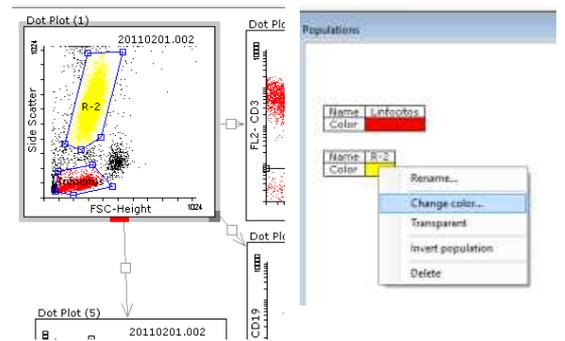
**13)** Actualización de la región: si selecciona el dot plot principal y mueve la región, p.ej. para recoger algunos linfocitos que hayan quedado fuera, verá que los demás dot plots y sus estadísticas se actualizan. Compruébelo llevando la región directamente sobre los monocitos.

(En cualquier momento puede **guardar el trabajo** para abrirlo más tarde y continuarlo donde lo dejó. Para ello, en el menú superior clique *File, Save Analysis as...* Es conveniente que guarde los files y su análisis en la misma carpeta. Para retomar el análisis clique *File, Open Analysis...*)

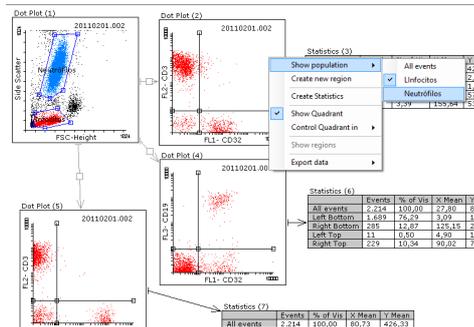


**14)** Coloque la región de nuevo en linfocitos y cree ahora una para neutrófilos: seleccione el dot plot principal y clique con el secundario *Create new region*. Siga los pasos del apartado 4).

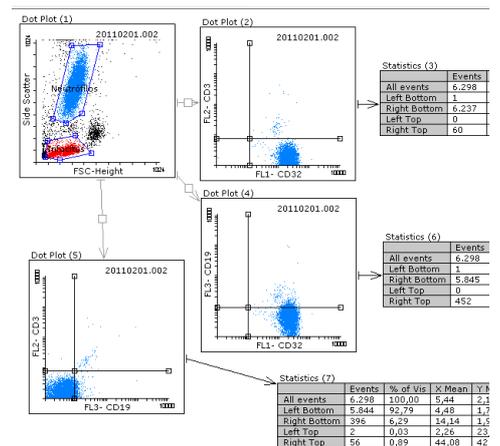
En la ventana *Populations* cambie "R-2" por "Neutrófilos" y cambie el color amarillo que aparece por defecto por el azul. En caso de superposición de regiones, las células adquieren el color de la última región trazada.



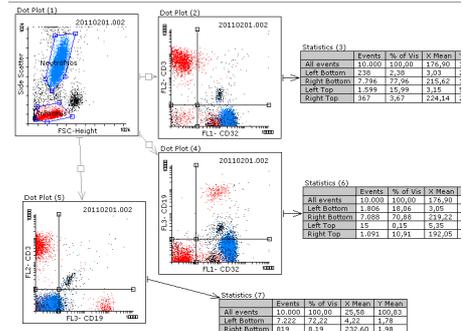
**15)** En cada uno de los dot plots secundarios clique *Show population, Neutrófilos*. Aparecerá el análisis de cada parámetro en los neutrófilos.



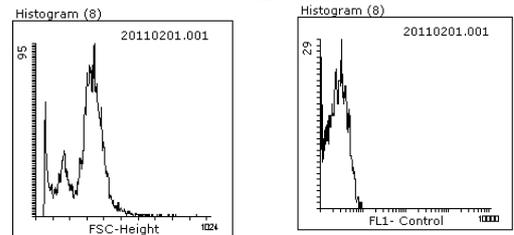
Observe que el fondo de fluorescencia puede ser mayor que el de los linfocitos y necesite reposicionar los cuadrantes retrocediendo al file *20110201.001*



16) Si ahora clicas en cada dot plot *Show population, All events* podrá obtener una imagen conjunta de todas las poblaciones leucocitarias. Recuerde que los monocitos no los hemos tocado y permanecen en negro.

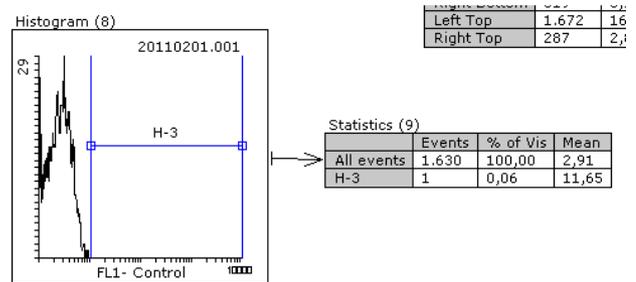


17) Representación mediante histogramas. Para crear un histograma, en la ventana *Main* pulse *Create, Visualization tools, Histogram*. Mueva la nueva ventana a la parte de debajo de la pantalla y seleccione el archivo de datos a analizar: *File, Open FCS, 20110201.001* y pulsar Abrir. Por defecto representará el parámetro FSC como aparece a la derecha. Cambie FSC por FL1 y muestre la población de linfocitos igual que hizo en los dot plot.

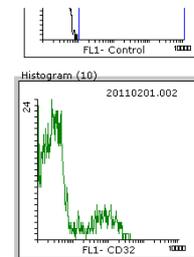


18) En la ventana *Tool properties* de la derecha puede cambiar los atributos de este histograma, como su color de relleno. Para cambiar la escala del eje Y, clique con el secundario sobre el valor numérico que aparece en el eje y cambie automático por *Custom Y-scale*.

19) Cree una región para separar la fluorescencia de fondo de la específica (igual que los cuadrantes en los dot plots): con el botón secundario seleccione *Create new región*, sitúese con el ratón en el centro del recuadro clique y arrastre a la derecha. Retóquelo clicando en los cuadrados azules para que quede como se muestra a la derecha. Cree la estadística y deje únicamente las tres primeras columnas (ver paso 9).



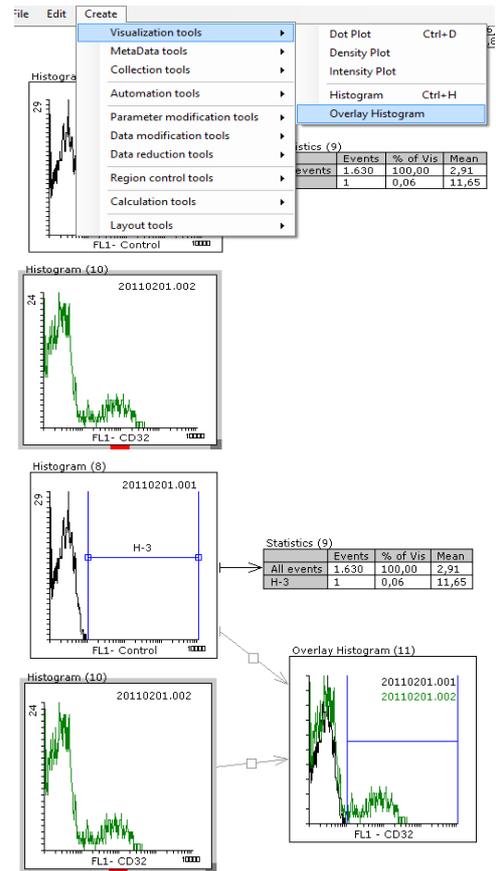
20) Cree otro histograma debajo y muestre el siguiente archivo (*20110201.002*). Seleccione linfocitos y el parámetro FL1. En la ventana *Tool properties* cámbiele el color de línea al verde.



21) Superponga ahora los dos histogramas: seleccione *Create Visualization tools, Overlay Histogram*. Aparecerá una ventana. **Conecte los histogramas de interés a esta ventana.**

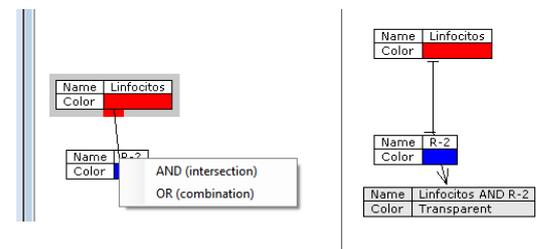
Si no tienen el mismo texto en el título del eje X debe ponérselo manualmente a la superposición, para ello seleccione esta nueva ventana, clique el secundario, *Use custom axis title* y ponga el título correspondiente, en este caso FL1 CD32. Verá que aparecen ambos histogramas en la misma ventana, de modo que puede comparar el marcaje específico (CD32 del file segundo) con el fondo (file primero).

Si alguno de los histogramas tiene una región, aparecerá también en la superposición. Sin embargo, no puede aplicarse estadística, tiene la utilidad de comparar visualmente.

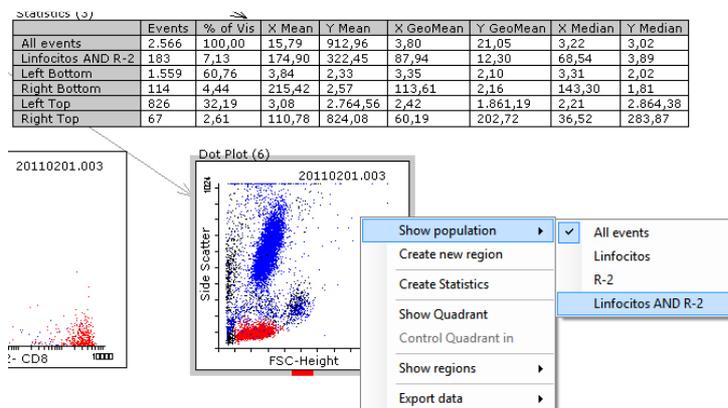


22) Para combinar regiones de manera lógica (AND / OR): conecte las regiones de interés en la ventana *Populations* y especifique AND u OR.

Ejemplo: seleccionar células CD16+ con una región (R2) y combinar con la región de los linfocitos (veremos que las estadísticas se actualizan mostrando una línea adicional que corresponde a la nueva población delimitada por la región lógica).



23) Sitúese sobre el dot plot de interés y con el botón secundario señale que muestre la población correspondiente a la región lógica creada.



**24)** Como ejercicio de autoevaluación, intente responder a las siguientes preguntas revisando los dot plots e histogramas generados:

- *¿Qué células tienen más autofluorescencia, los linfocitos o los neutrófilos?*
- *¿Tiene el individuo del que se han obtenido estas muestras linfocitos T y B? Si los tiene, ¿qué porcentaje de sus linfocitos son T y qué porcentaje son B?*
- *¿Qué porcentaje de neutrófilos de este individuo expresan el marcador CD32?*
- *¿Qué porcentaje de los neutrófilos expresan CD3 o CD19?*
- *¿Podría decir si los monocitos son CD32+ o CD32-?*