



# MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN INMUNOLOGÍA CLÍNICA. 2ª Edición.

Profesor: Gonzalo Rubio Pedraza

- Normas de seguridad en el laboratorio de inmunología.
- Detección, caracterización y titulación de isohemaglutininas.
- Tipaje HLA de clase I.
- Enzimoimmunoensayo (ELISA) para la cuantificación de IgA en saliva.
- Manual de Flowing para microaula de citometría de flujo.

Copyright: © 2017 Gonzalo Rubio Pedraza.  
**Acceso abierto** Este manual se distribuye  
bajo los términos de la licencia internacional  
Creative Commons 4.0

Copyright: © 2017 Gonzalo Rubio Pedraza.  
**Open Access** This manual is distributed under  
the terms of the Creative Commons Attribution  
4.0 International License.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

**Resumen:** El material del laboratorio puede ser peligroso, en consecuencia, nos informamos antes de usarlo, lo manipulamos protegidos y desechamos los residuos sin exponer a los demás.

- 1) Todo **material biológico humano** se manipula como si fuera **potencialmente infeccioso**.
- 2) Por norma, utilice **bata, guantes y gafas de protección** para manejar muestras y reactivo de inmunodiagnóstico. Los guantes se cambian si se manchan. Las heridas se traen cubiertas con apósitos impermeables. La ropa de calle es un elemento adicional de protección, se desaconseja el pantalón corto o el calzado abierto.
- 3) Para trabajar se colocan las muestras, reactivos etc. en la **parte delantera y al fondo de la zona de trabajo**, así se evita golpearlos con los brazos en un descuido. El material punzante no debe sobresalir de la mesa.
- 4) Para abrir tubos de vidrio (ej. los de sangre) o tubos eppendorf, se sujetan **envueltos en varias capas de papel secante**. Esto protege en caso de rotura o salpicadura.

- 5) Antes de utilizar un reactivo observe si tiene **pictogramas de peligrosidad**. Entre otros verá:



Tóxico



Corrosivo



Peligro  
(mutágenos  
y otros)



Atención  
(irritantes  
y otros)



Riesgo  
medio-  
ambiental



Riesgo  
biológico (en  
residuos)

- 6) En el laboratorio **no se pipetea con la boca**. En su lugar se emplean micropipetas de mano y/o pipeteadores eléctricos. Tampoco se debe comer, beber, aplicarse cosméticos u oler reactivos o muestras directamente.
- 7) **Nunca** quite una **punta** de pipeta usada **con los dedos**, o reencapuche una aguja, aunque se usen guantes.
- 8) Los **residuos** y el material punzante (puntas de pipeta, agujas, hojas de bisturí, cubreobjetos y similares) se desechan en los **contenedores repartidos por las mesas** para evitar la exposición de los compañeros. No arrojar a la papelería o desague material usado sin consultar al profesor.
- 9) **Evite que se manchen las mesas**. En caso de vertido: recoger con secante y descontaminar la superficie con papel desechable impregnado en lejía común al 10% v/v en agua del grifo. No aclarar.
- 10) En general, a las personas que se exponen a muestras de origen humano, entre los que se incluyen los estudiantes de Bioquímica, se les recomienda vacunarse contra **hepatitis B**. Es muy probable que a usted le vacunaran a los 11-12 años, si no es el caso, debe saber que se recomienda que inicie la vacunación.

### ACCIDENTES:

- 1) Las salpicaduras o derrames en la piel intacta se deben lavar inmediatamente con jabón y agua abundantes.
- 2) Las salpicaduras a mucosas (ej. a la boca), deben lavarse con agua corriente durante 15 minutos. Las salpicaduras a los ojos se lavarán de inmediato con frasco lavavojos o con agua corriente manteniendo los ojos muy abiertos con los dedos.
- 3) Las inoculaciones percutáneas (ej. arañazo o corte con instrumental usado) deben lavarse con agua y jabón, dejar, en su caso, fluir la sangre libremente 3 minutos, desinfectar con povidona yodada o gluconato de clorhexidina y cubrir con un apósito impermeable. En todos los casos se comunicará el incidente al profesor.

## DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y TITULACIÓN DE ISOHEMAGLUTININAS

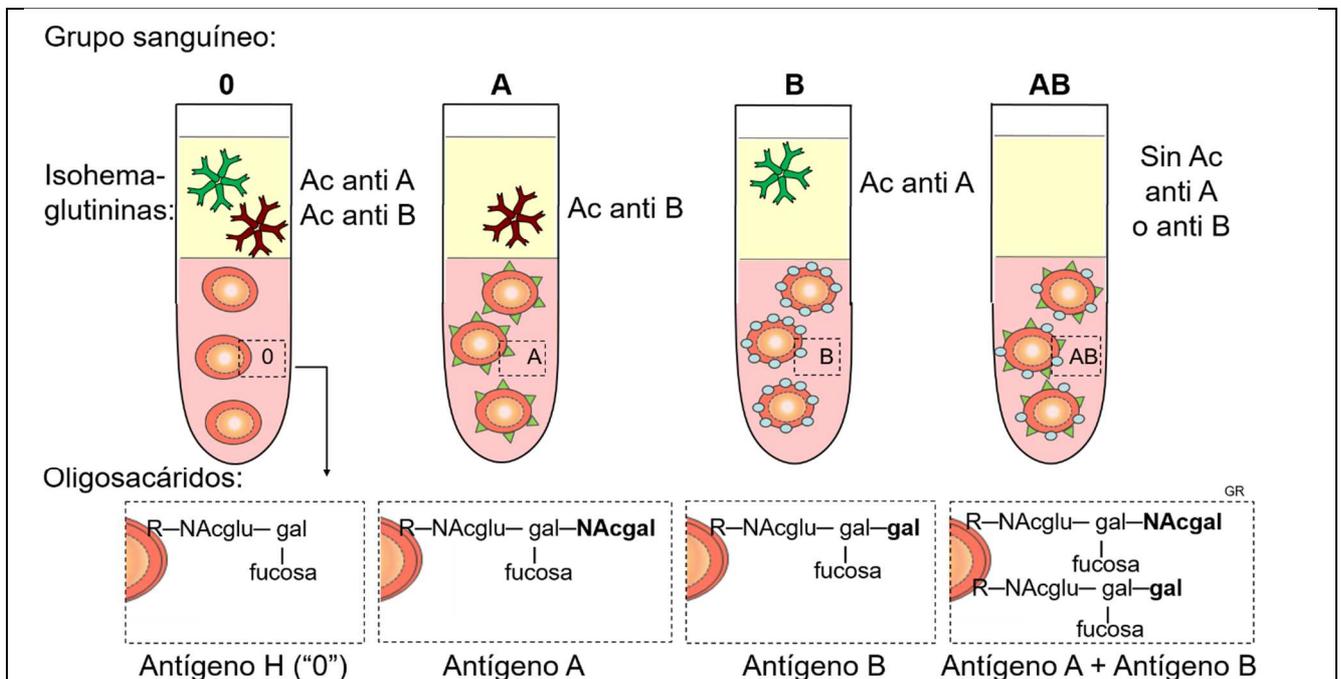
**Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:**

- Manejar con seguridad muestras de sangre potencialmente infecciosas.
- Interpretar reacciones de aglutinación de Ag particulados.
- Preparar suspensiones de hematíes fenotipados A, B, AB y O.
- Llevar a cabo pruebas cruzadas y caracterizar isohemaglutininas.
- Preparar y titular antisueros para determinar el grupo hemático.

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

La determinación del grupo sanguíneo es una técnica habitual en la transfusión de hemoderivados. Es necesaria porque sistema inmunitario de algunos individuos rechaza los hematíes de otros. Esta reacción inmunológica está mediada por las **isohemaglutininas**, que son anticuerpos (Ac) fácilmente detectables y cuantificables ya que forman aglutinados visibles cuando se enfrentan a hematíes específicos. La detección de isohemaglutininas en el suero o plasma de un individuo tiene un interés triple. Por una parte, se requiere para determinar correctamente el grupo sanguíneo y evitar **reacciones transfusionales** graves. Por otra, sirve para evaluar la capacidad de producir Ac de una persona, algo muy útil para el **diagnóstico de inmunodeficiencias**. Finalmente, sirve para obtener **reactivos** para tipaje de grupos sanguíneos.

Se pueden determinar al menos 27 sistemas antigénicos hemáticos con sus correspondientes variantes alélicas. Los más importantes en transfusión sanguínea, por su alta inmunogenicidad, son los sistemas H - ABO y Rhesus (Rh).



**Figura 1.** Sistema H-ABO. Se indican los grupos sanguíneos mayoritarios, los oligosacáridos responsables y las isohemaglutininas presentes.

## Sistema H – ABO:

Los epítomos responsables son **carbohidratos** presentes en glicoesfingolípidos y glicoproteínas de membrana (Figura 1), que están codificados por dos loci génicos. El locus H, en el cromosoma 19, codifica una enzima fucosil transferasa que adiciona fucosa a un oligosacárido precursor, formando el denominado “**antígeno**” H. Sobre éste actúa el producto del locus ABO, en el cromosoma 9, que tiene tres alelos: los **alelos A y B** son codominantes y codifican dos glicosil transferasas que unen, respectivamente, N-Acetil galactosamina y galactosa. El **alelo 0** es un gen deletado sin actividad enzimática, de modo que en homocigosis deja la secuencia H intacta. Los genotipos responsables de los cuatro grupos mayoritarios son: 00, *grupo 0*; AA y AO, *grupo A*; BB y BO, *grupo B* y el AB, *grupo AB*. En este último, los hematíes tendrán oligosacáridos con una y otra modificación.

La importancia inmunológica de los antígenos H-ABO está en el hecho de que las personas toleran sus propios oligosacáridos pero **sintetizan en gran cantidad Ac frente a los otros grupos**. Como se producen espontáneamente, es decir sin contacto previo con hematíes de dichos grupos, se consideran “Ac naturales”. En el recién nacido alcanzan un nivel detectable en plasma a las pocas semanas de edad. Hay evidencias que indican que en realidad se sintetizan en respuesta a bacterias de la flora intestinal, pólenes y/o a sustancias presentes en alimentos de origen animal, que contendrían oligosacáridos con reactividad cruzada.

## Sistema Rhesus:

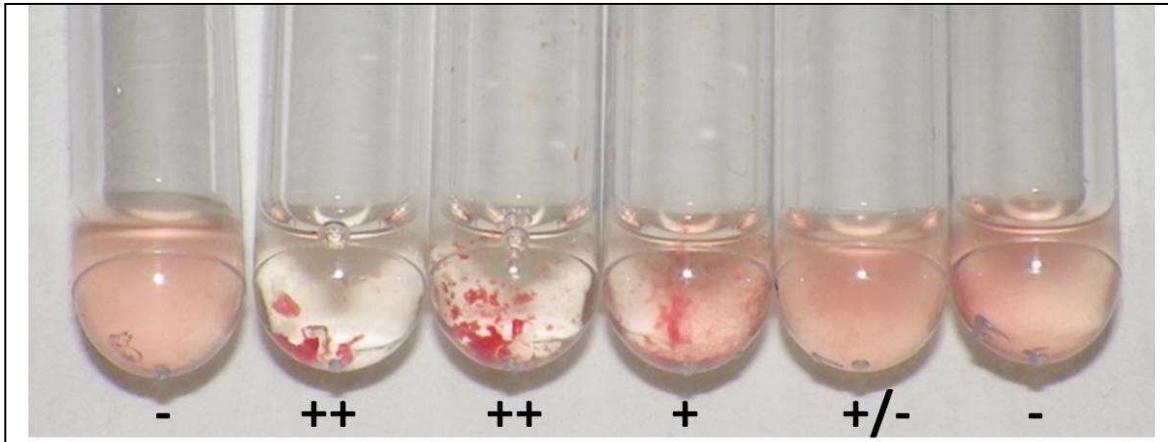
Los epítomos responsables están en dos proteínas integrales de membrana codificadas en tándem el cromosoma 1, denominadas **RhCE (gen RHCE)** y **RhD (gen RHD)**, y que resultan de la duplicación de un gen ancestral. La proteína RhD es la más importante a efectos transfusionales. Las personas que expresan RhD se caracterizan como “Rh positivas”, mientras que si carecen de RhD por delección parcial o completa del gen RHD, serán “Rh negativas”. Se utiliza también la letra “d” para indicar la carencia de D o fenotipo D-negativo. Como RhD se diferencia de RhCE en 30-35 aminoácidos, la proteína RhD resulta muy inmunogénica para las personas Rh negativas. La carencia de RhCE, por su parte, es muy infrecuente.

Los anticuerpos anti RhD, que son IgM e IgG, no aparecen espontáneamente en las personas Rh negativas, sino que son consecuencia de la exposición a hematíes D, por ejemplo tras una transfusión incorrecta o en el embarazo si la madre gesta un feto que expresa RhD.

## Determinación de antígenos eritrocitarios e isohemaglutininas:

La determinación correcta del grupo sanguíneo requiere el análisis de los eritrocitos para ABO y D mediante Ac específicos anti-A, anti-B y anti-D. Esto se denomina **grupo hemático** y suele llevarse a cabo en sangre completa, sin que interfiera la presencia de plasma, leucocitos o plaquetas. Después se analiza el suero o el plasma para detectar la presencia de isohemaglutininas, lo que se denomina **grupo sérico** o plasmático, utilizando para ello hematíes fenotipados A, B y O lavados y un paso de centrifugación y resuspensión. En ambas pruebas, el resultado positivo será la aglutinación clara de los hematíes. La asignación del grupo sanguíneo definitivo se hace con ambos resultados, que deben ser **coherentes**. Los resultados discrepantes deben analizarse con extremo cuidado por su importancia sanitaria y porque pueden dar información valiosa sobre el polimorfismo de los grupos sanguíneos.

Para titular las isohemaglutininas, se diluye seriadamente la muestra de suero o plasma y se añade una cantidad fija de los hematíes fenotipados que corresponda. Tras procesar adecuadamente, se determina si hay aglutinación de manera visual (Figura 2). El **título** será la **dilución máxima aglutinante**. Las personas con deficiencias en la producción de Ac mostrarán títulos más bajos de lo normal o incluso carecerán de isohemaglutininas.



**Figura 2.** Determinación visual de la aglutinación de hematíes fenotipados.

Otra de las pruebas de laboratorio que se suele llevar a cabo antes de una transfusión, dependiendo de la urgencia del caso, es la **prueba cruzada**, que examina la compatibilidad entre suero del receptor con las células, hematíes en este caso, del/los donantes que va a recibir. Se realiza mezclando una muestra de suero del receptor con hematíes lavados de la/s bolsa/s de donación. Tras incubar y centrifugar se examinan para hemólisis y aglutinación. Cuando estas últimas no se presentan se dice que la prueba cruzada es compatible y la transfusión es posible.

#### EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Centrífuga para tubos Eppendorf (tipo Minifuge).</li> <li>- Centrífuga para tubos de 12x75mm.</li> <li>- Microscopio.</li> <li>- Portaobjetos.</li> <li>- Tubos Eppendorf.</li> <li>- Tubos de poliestireno de 6.5x38mm o, en su lugar, tubos de 12x75 o similares.</li> <li>- Pipetas de 5-40, 40-200 y 200-1000µl y puntas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lancetas de un solo uso.</li> <li>- Algodón y alcohol etílico de 70°.</li> <li>- Anticuerpos monoclonales anti-A, anti-B y anti-D.</li> <li>- Suero salino fisiológico (NaCl 0.9% p/v).</li> <li>- Muestras de sangre anticoagulada con heparina o EDTA (un tubo por pareja).</li> <li>- Muestras de plasma para titulación de isohemaglutininas (una por pareja).</li> </ul>
---	--

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

### Determinación del grupo hemático:

- 1) Cada pareja recibe un tubo de sangre anticoagulada con heparina o EDTA *[si algún alumno desconoce su grupo sanguíneo puede utilizar su propia sangre siguiendo las anotaciones de cada paso]*.
- 2) Centrifugar 5 minutos a 400xg.
- 3) Preparar dos tubos Eppendorf rotulados con el número de la muestra o iniciales del alumno. En uno de ellos añadir 1 ml de suero salino fisiológico. Preparar también un portaobjetos y rotular en la esquina inferior derecha.
- 4) Finalizada la centrifugación, tomar 1 ml de plasma y depositarlo en el tubo Eppendorf vacío.
- 5) Tapar el tubo de sangre con su tapón o con un trozo de parafilm y resuspender por agitación suave.
- 6) Una vez resuspendida la sangre, tomar 30  $\mu$ l y pipetearlos en el tubo Eppendorf con suero fisiológico. Guardar a temperatura ambiente, se procesará más adelante.
- 7) Sobre el porta pipetear tres gotas de 20  $\mu$ l de sangre bien separadas entre ellas. *[Masajear energicamente la yema de un dedo y limpiar con algodón humedecido en alcohol. Dejar unos segundos que evapore y pinchar con la lanceta estéril. Sobre el portaobjetos, depositar tres gotas de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, bien separadas. Tomar 30  $\mu$ l y pipetearlos en un eppendorf limpio con 1 ml de suero fisiológico]*.
- 8) Sobre cada gota de sangre del porta se pipetea 10  $\mu$ l de los Ac correspondiente. El orden recomendable es, de izquierda a derecha: anti-A, anti-B, anti-D.
- 9) Mezclar bien la sangre y el Ac con una punta de pipeta limpia para cada gota.
- 10) Casi instantáneamente podrán ver los resultados de A y B. Para D, espere al menos tres minutos moviendo el porta ligeramente. En caso de duda, visualice con transiluminador o microscopio.
- 11) Anote el número de su muestra de sangre.....y el resultado H-AB0.....RhD.....

Represente 8 portas con los resultados posibles e indique el AB0 y RhD correspondiente:

**Lavado y preparación de hematíes al 2%:**

- 12) Anotar en el tubo Eppendorf de los 30  $\mu$ l de sangre el grupo hemático obtenido (A; B; AB y O (indicar el RhD en el caso del O) y el nº de la muestra.
- 13) Centrifugar 1 minuto en la Minifuge.
- 14) Aspirar y descartar el sobrenadante (preferentemente con bomba de vacío).
- 15) Resuspender enérgicamente el pellet y añadir 1 ml de suero fisiológico.
- 16) Repetir los pasos 13 y 14.
- 17) Resuspender en 1485  $\mu$ l de suero fisiológico. A esto se denomina *hematíes fenotipados y lavados al 2% (v/v)*, y serán compartidos por el grupo.

**Detección y caracterización de isohemaglutininas en suero o plasma:**

- 18) Tomar tres tubos de poliestireno de 6.5x38 y rotular A, B y O respectivamente. Colocarlos sobre una placa microtiter de 96 pocillos, que hará de gradilla.
- 19) Pipetear 50  $\mu$ l del plasma de nuestra sangre, el que tomamos en el paso 3, en cada uno de los tubos.
- 20) Pipetear 25  $\mu$ l de hematíes al 2% A en un tubo, hematíes B en otro y hematíes O en el último.
- 21) Mezclar y centrifugar 15 segundos en la Minifuge.
- 22) Dispersar el pellet y determinar aglutinación (ver Figura 2).

Resultados de la muestra número: ..... de grupo hemático ABO: ..... y RhD:.....

Represente los resultados obtenidos en los tres tubos:

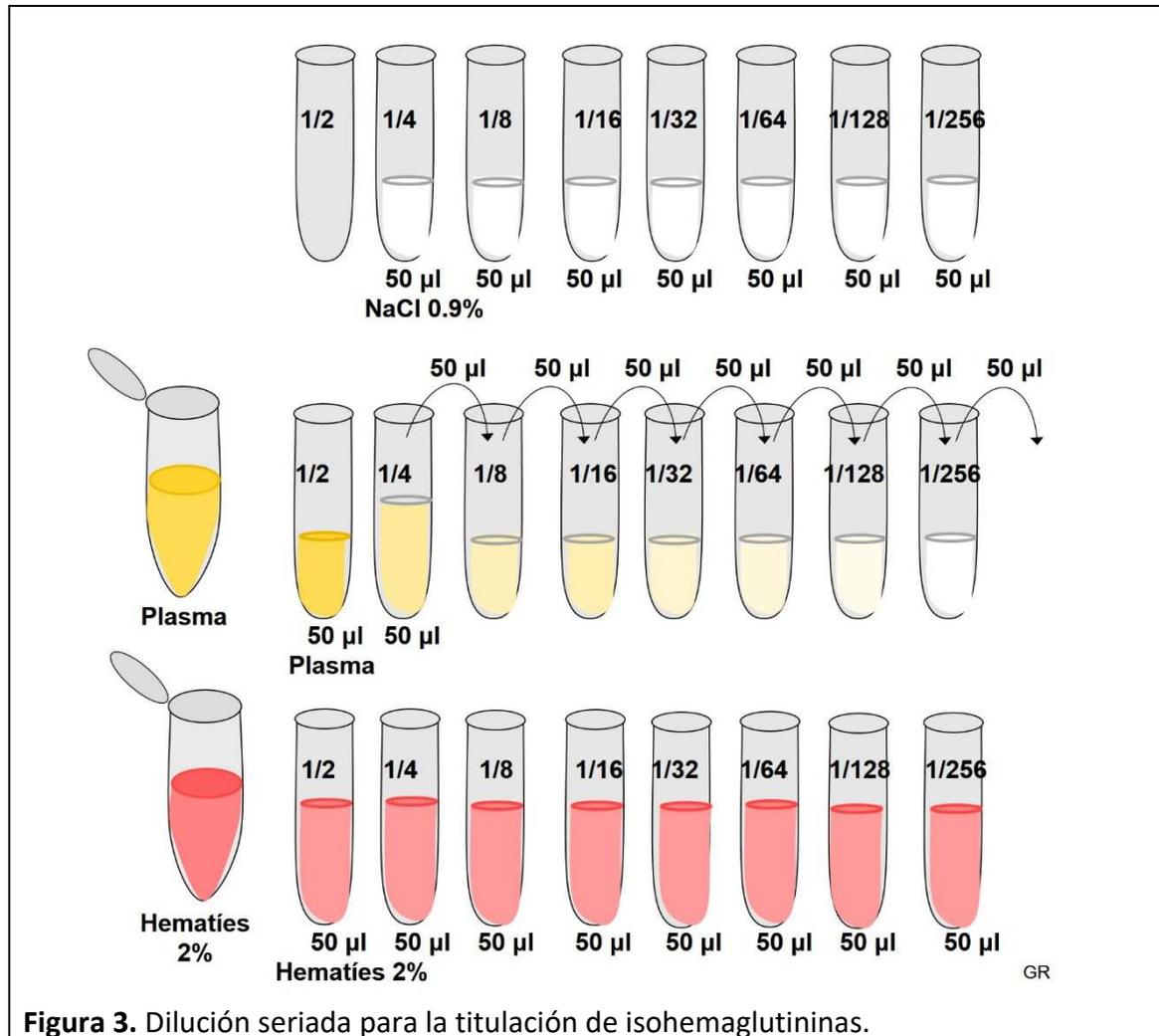
Isohemaglutininas (indique + o -): anti-A:..... anti-B:..... anti-O:.....

Razone si hay coherencia entre el grupo hemático y el grupo plasmático:

### Titulación de isohemaglutininas:

23) Tomar 8 tubos de 6.5x38 y rotularlos: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. Colocar en una placa-gradilla.

24) Pipetear 50  $\mu$ l de suero fisiológico en todos los tubos excepto en el rotulado 1/2 (Figura 3).



25) Pipetear 50  $\mu$ l de plasma problema en el primer y segundo tubo y mezclar. NOTA: si su tubo de sangre ha resultado ser AB, pida plasma de otro grupo al profesor.

26) Del segundo tubo tomar 50  $\mu$ l y pasarlos al siguiente. Mezclar y tomar 50  $\mu$ l y pasarlos al siguiente y así hasta el último tubo. Esto se denomina dilución seriada. Tomar 50  $\mu$ l del último tubo y descartar.

27) Pipetear en cada tubo 50  $\mu$ l de los hematíes al 2% que correspondan: A o B. Si titula un plasma de individuo O elija uno de ellos.

28) Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

29) Centrifugar 15 segundos en la Minifuge.

30) Dispersar el pellet y determinar aglutinación tal y como se indica en la Figura 2. Anote sus resultados en la tabla siguiente:

Titulación del plasma nº.....con hematíes lavados de fenotipo..... y nº.....								
Dilución final:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Aglutinación (marcar ++, +, +/-, -)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Este plasma podríamos utilizarlo como reactivo de laboratorio para determinar:								

Tabule los resultados medios de los plasmas analizados en el grupo de prácticas:

Resultados del grupo de prácticas: titulación de isohemaglutininas en plasma			
Plasmas de individuos	Hematíes al 2% usados	Rango	Título medio
A (n=.....)			
B (n=.....)			
O (n=.....)			
O (n=.....)			

Para finalizar, recoja el lugar de trabajo, desechando el material de un solo uso al contenedor de material infeccioso y complete el cuestionario de actividades grupales que le ha facilitado el profesor.



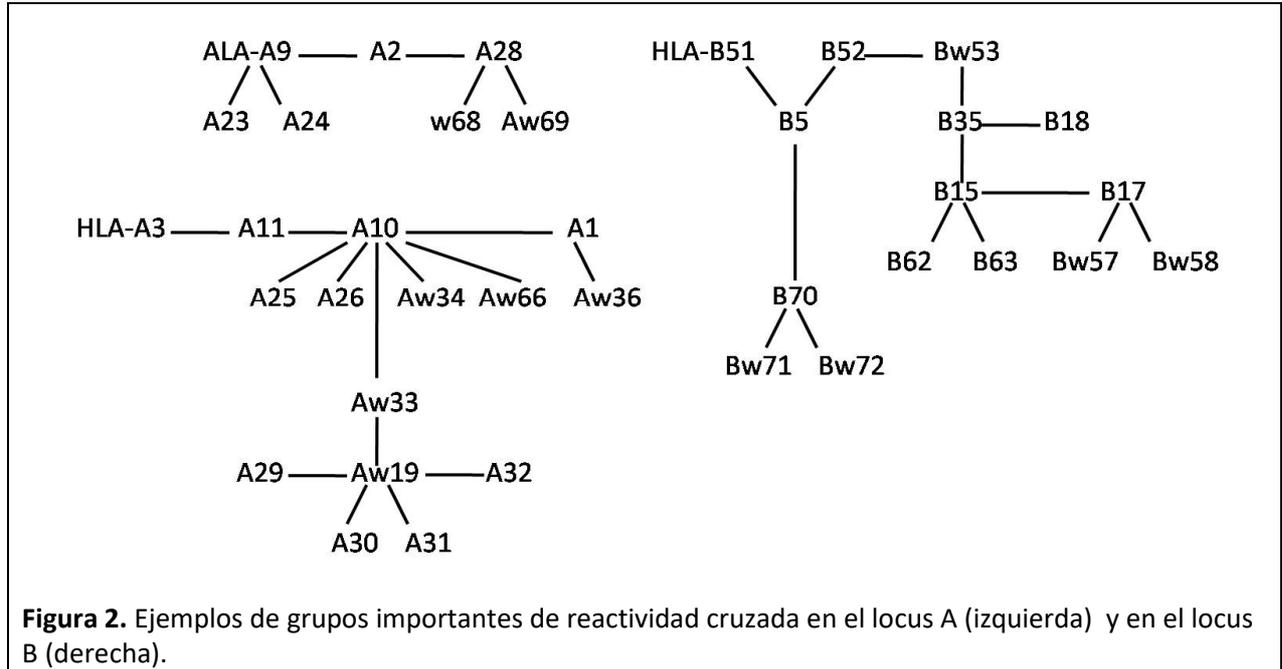
**Tabla 1.** Listado de alelos HLA-A, B, C y DRB1 más frecuentes en Caucasianos. HLA de clase I determinados por método de microlinfotoxicidad. HLA-DRB1 determinados por PCR-SSP.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1
01	07	01	01:01
02	08	02	01:02
03	13	03	01:03
11	18	04	03:01
23	27	05	04:01
24	35	06	07:01
25	38	07	08:01
26	39	08	09:01
29	44	12	10:01
30	45	14	11:01
31	49	15	11:04
32	50	16	12:01
33	51		13:01
66	52		14:01
68	57		15:01
74	60		15:02
	62		16:01
	65		

El fundamento de la técnica es: en una placa con múltiples pocillos (placa Terasaki) incubaremos **linfocitos** del paciente a tipar (en este caso Fuensanta), con un **panel de anticuerpos frente a moléculas HLA específicas** (Figura 1). Los Ac se unirán a las moléculas HLA de la superficie de las células en caso de reacción positiva. En un paso posterior se añade **complemento** a todos los pocillos. En aquellos pocillos donde se haya producido reacción entre anticuerpos y moléculas HLA se activará el complemento sobre la membrana de las células, y éstas se lisarán. Para determinar si las células están **lisadas** (reacción +) o **vivas** (reacción -), se añade un **colorante de exclusión**, denominado Azul Tripano, que sólo es capaz de penetrar en las células muertas. Al observar los pocillos con un microscopio de contraste de fase, se podrá determinar en cada caso si las células están lisadas (coloreadas de azul = reacción positiva) o vivas (claras y refringentes = reacción negativa).

Las células que se emplean habitualmente en los estudios de histocompatibilidad son los linfocitos. La razón es que se aíslan fácilmente de sangre periférica, o de bazo y ganglios linfáticos si se trata de donantes cadáveres, y mantienen su viabilidad varios días in vitro. Los Ac para el tipaje son monoclonales o proceden de sueros de multíparas y con frecuencia son una **mezcla de Ac** que reconocen más de una especificidad HLA (ver las plantillas de la última página). Debido al alto polimorfismo alélico de las moléculas de histocompatibilidad, para determinar el tipaje HLA de un individuo, se suelen utilizar 200 Ac distintos o incluso más, empleando siempre más de un Ac para cada especificidad.

A la hora de interpretar los resultados, hay que tener en cuenta que algunas moléculas comparten epítomos con otras, formando grupos de **reactividad cruzada**. Así, por ejemplo, los anticuerpos anti HLA-A\*03, pueden reconocer también epítomos en HLA-A\*11 (Figura 2).



#### EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfocitos de Fuensanta aislados por Ficoll-Hypaque.</li> <li>- Tubos de poliestireno de 5ml y gradilla.</li> <li>- Centrífuga para tubos eppendorff</li> <li>- Placas Terasaki</li> <li>- Pipetas de 2-20µl y puntas (alternativamente, dispensador Hamilton)</li> <li>- Aceite mineral (Merck 7174)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batería de anticuerpos anti moléculas HLA de clase I, control negativo (suero AB diluido en medio de cultivo) y control positivo poliespecífico.</li> <li>- Complemento.</li> <li>- Azul tripano (el comercial al 0.4%) diluido 1/5 en PBS.</li> <li>- Microscopio invertido.</li> </ul>
---	---

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL** (por parejas):

Las plantillas de más abajo representan tres placas Terasaki con los Ac a pipetear. Cada pareja utilizará una, la que le asigne el profesor. En las columnas vacías anotarán, al final de la práctica, sus resultados y los de sus compañeros.

Ac anti productos alélicos **HLA-A**

Ac anti productos alélicos **HLA-B**

Ac anti productos alélicos **HLA-C**

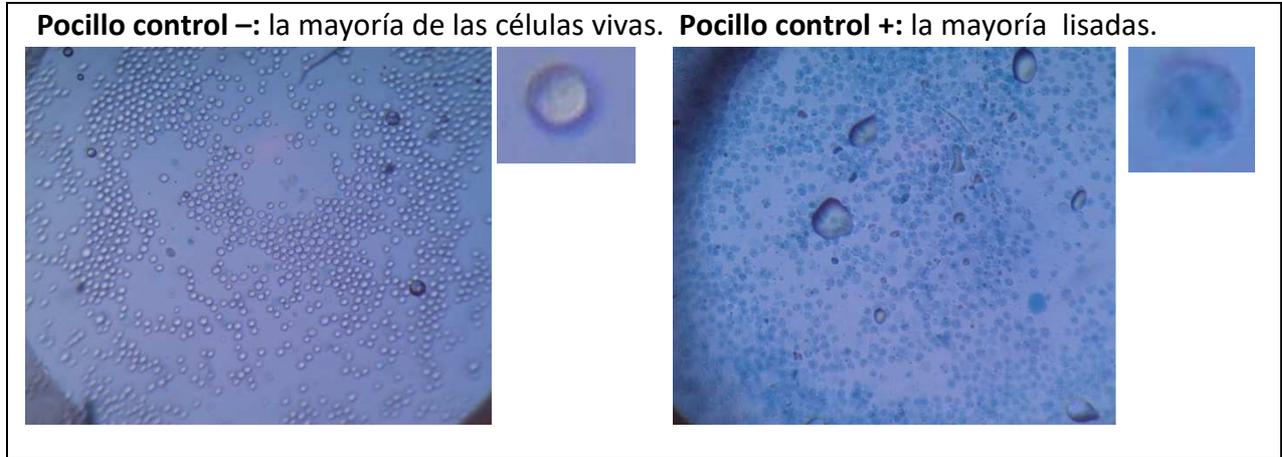
1	Control -					
2	Control +					
3	A*01					
4	A*02					
5	A*03					
6	A*11					
7	A*23					
8	A*23+24					
9	A*25					
10	A*30+31+74					
11	A*34+66					
12	A*68+69					

1	Control -					
2	Control +					
3	B*07					
4	B*08+59					
5	B*13					
6	B*18					
7	B*27+57+A*03					
8	B*35					
9	B*44+45					
10	B*51+52					
11	B*57+58					
12	B*60+61+48					

1	Control -					
2	Control +					
3	C*01					
4	C*02+B*70					
5	C*02+06					
6	C*03					
7	C*04+02					
8	C*04					
9	C*05					
10	C*06+04					
11	C*07+A*01					
12	C*05+08					

- 1) Comprueben que tiene todos los Ac necesarios para completar la plantilla asignada.
- 2) En una placa Terasaki, seleccionar una columna limpia de 12 pocillos y pipetear 6µl de parafina líquida en cada uno de ellos.
- 3) Pipetear 3.5 µl (\*) de cada Ac en su pocillo respectivo. La punta de la pipeta debe tocar el fondo del pocillo. Si cambian el orden de los Ac con respecto a lo indicado en la plantilla, anótenlo claramente.  
(\*) Nota: Este pipeteo y los siguientes se realizan hasta el primer tope para evitar burbujas.
- 4) Pipetear 4 µl de las células de Fuensanta por pocillo cuidando de que se mezclen con la "gota" de Ac pipeteada antes.
- 5) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Pipetear 6 µl de complemento por pocillo, cerciorándose de que se mezcla con las células y Ac.
- 7) Incubar entre 30 minutos y 1 hora a temperatura ambiente.

- 8) Pipetear 6  $\mu$ l/pocillo de Azul Tripano, previamente diluido a 1/5 (preguntar si está ya diluido).
- 9) Dejar sedimentar las células 5 minutos y leer en el microscopio invertido a 200x.
- 10) Lectura al microscopio: si la técnica se ha realizado correctamente, observaremos:



Ahora leeremos el resto de los pocillos y les anotaremos un resultado – o + según el criterio anterior. Cuando observemos cantidades similares de vivas y muertas, anotaremos + $\downarrow$ .

- 11) Anote sus resultados en la pizarra y copie los de sus compañeros. Con los datos de todo el grupo, obtenga el **Tipaje HLA-I completo** de las células de Fuensanta:

HLA-A* ,	B* ,	C* ,
----------	------	------

Para finalizar, descarte en el contenedor el material sucio, deje el lugar de trabajo ordenado y complete los ejercicios de emparejamiento donante-receptor que les proporcione el profesor.

## ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IgA EN SALIVA

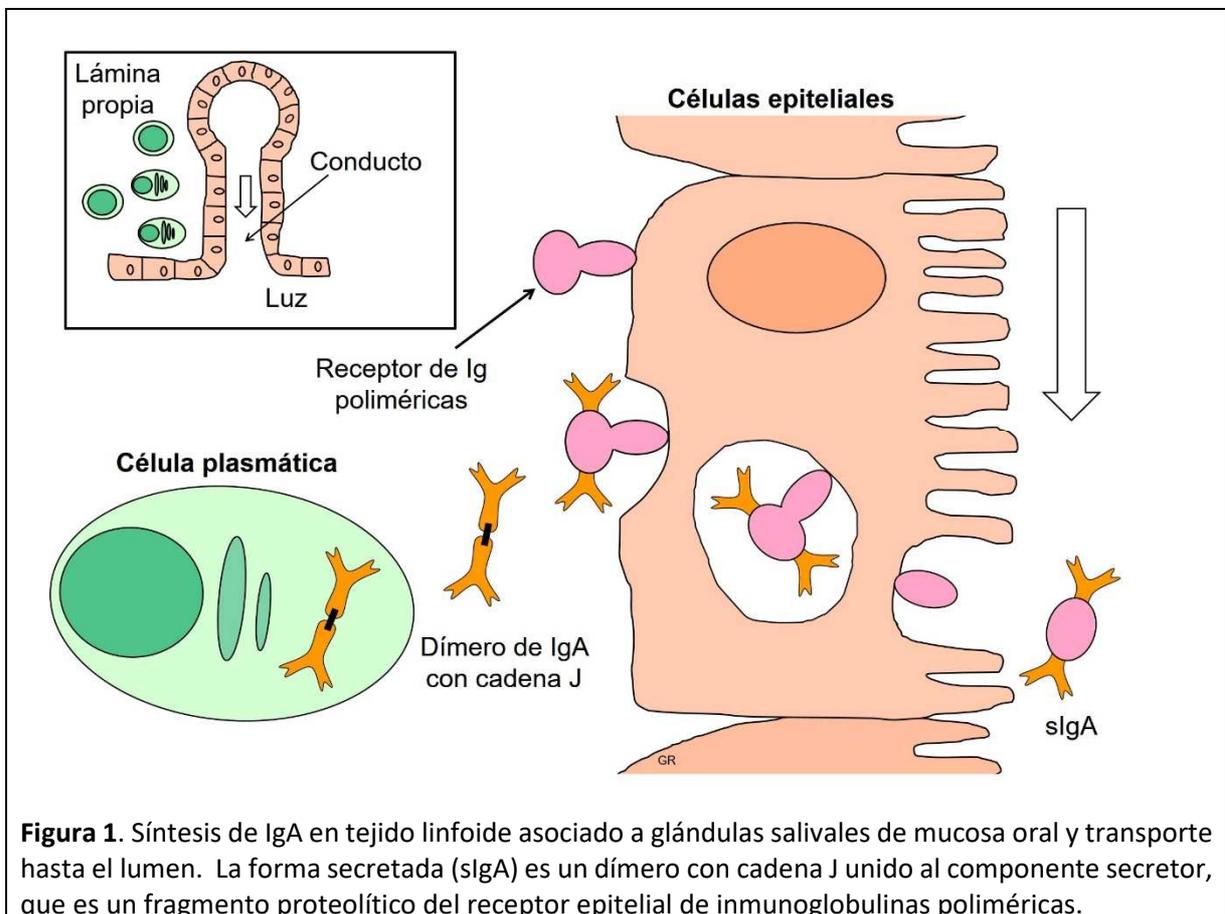
Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Diseñar un ELISA cualitativo o cuantitativo para Ac o cualquier otra proteína diana.
- Inmovilizar Ac o Ag a un soporte sólido.
- Llevar a cabo todas las fases de un ELISA.
- Determinar concentraciones en el tramo adecuado de una gráfica patrón.

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

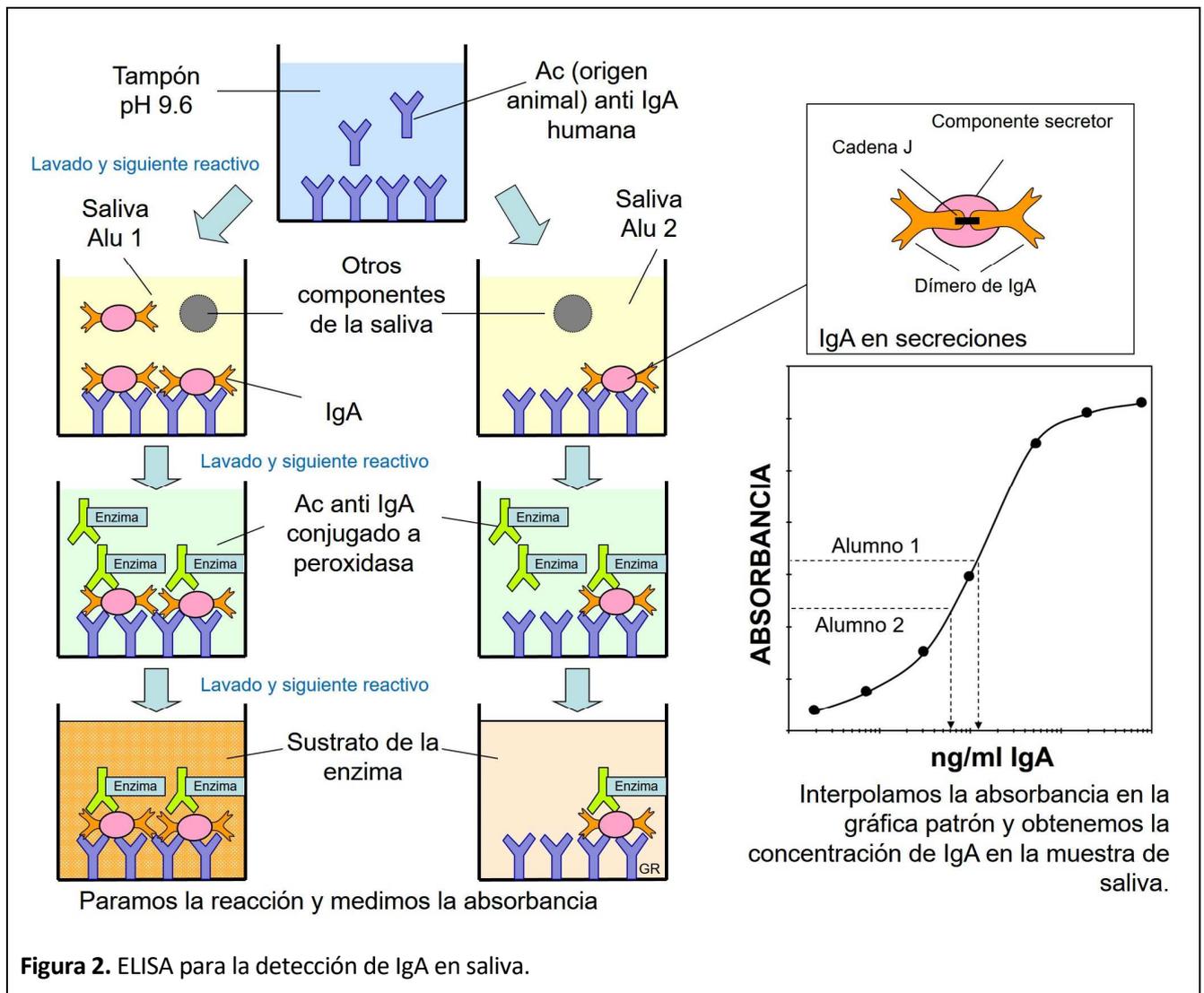
La IgA es una inmunoglobulina presente en suero y se caracteriza por ser la predominante en las **secreciones** (lágrimas, saliva, leche materna y, en general, secreciones mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario). La forma secretada se sintetiza como un dímero por células plasmáticas del tejido linfoide asociado a la mucosa (Figura 1) y se secreta a la cara luminal del epitelio acomplejada a un polipéptido denominado *componente secretor*, que da resistencia a proteasas. Una función esencial de la IgA en las secreciones es el bloqueo de la interacción de virus y otros microorganismos con las células epiteliales para así evitar la infección.

La **deficiencia selectiva de IgA** es la inmunodeficiencia primaria más frecuente y afecta a uno de cada 700 individuos de origen europeo. En estos casos, los niveles de IgA en suero y secreciones son muy bajos pero detectables. Aunque en algunos afectados aumenta la incidencia de infecciones digestivas y respiratorias, a veces graves, la mayoría parecen sanos.



**Figura 1.** Síntesis de IgA en tejido linfoide asociado a glándulas salivales de mucosa oral y transporte hasta el lumen. La forma secretada (sIgA) es un dímero con cadena J unido al componente secretor, que es un fragmento proteolítico del receptor epitelial de inmunoglobulinas poliméricas.

La cuantificación de IgA en líquidos biológicos se realiza por diversas técnicas, pero siempre utilizando **anticuerpos anti IgA obtenidos en animales de experimentación**. Este tipo de “reactivos” son, en general, la única herramienta para distinguir de manera rápida y fiable unas proteínas de otras. Se obtienen vacunando repetidamente al animal (normalmente cabra, oveja conejo o ratón) con la proteína humana. Al cabo de unas semanas, el animal sintetiza una gran cantidad de Ac frente a dicha proteína. Estos Ac pueden purificarse de su suero o bien generar un Ac monoclonal a partir de sus linfocitos B. En ambos casos, se obtendrá un reactivo específico frente a la proteína humana de interés.



Por otra parte, la técnica o procedimiento denominado **ELISA** (acrónimo de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay o enzimoimmunoensayo en castellano), es la técnica inmunológica más empleada en los laboratorios clínicos. El nombre de la técnica viene de que aprovecha tanto la especificidad de unión de los Ac como la amplificación de señal que producen las enzimas al catalizar una reacción. Además, todo el proceso ocurre adsorbido a una superficie, generalmente plástica, bañada por líquidos. El ELISA se utiliza habitualmente para cuantificar o detectar la presencia de muchas sustancias de interés, generalmente proteínas, como son Ag microbianos, Ac frente a esos Ag, hormonas proteicas o marcadores tumorales. En cada caso, se utilizan Ac específicos para la proteína diana obtenidos de animales de experimentación como se ha indicado antes. En esta práctica cuantificaremos IgA de saliva

utilizando un ELISA que nos dará la información que buscamos en pocas horas, aunque por conveniencia lo dividiremos en varias jornadas. Nuestro ELISA, como la mayoría de estos ensayos, sigue un patrón de **tres “capas”** (Figura 2). Comienza con la inmovilización a pocillos de poliestireno de Ac anti IgA humana. Esta primera capa se suele poner uno o varios días antes y se denomina capa de **captura**. Después de lavar los Ac no unidos, añadiremos las muestras de saliva a los pocillos (capa **problema**) e incubaremos. Si contienen IgA ésta será capturada por la primera capa. Después de lavar para eliminar los componentes de la saliva no unidos, se añadirá un Ac anti IgA humana conjugado a la enzima peroxidasa. Esta capa se denomina capa de **detección**. Los Ac de la capa de detección, con su enzima, se unirán en una cantidad proporcional a la IgA presente. Después de incubar y lavar, se añadirá el/los sustratos de la enzima. El sustrato se elige para que el producto de la reacción sea una sustancia coloreada que se pueda medir con un espectrofotómetro especial. La absorbancia medida estará en relación directa con la cantidad de enzima, y ésta a su vez con la cantidad de IgA. Para saber qué concentración de IgA tiene cada saliva problema, compararemos sus absorbancias con las de unos **patrones** que tienen una **cantidad conocida de IgA** y que procesaremos en paralelo.

Cada estudiante determinará la concentración de IgA en su saliva. Recogeremos los datos de todo el grupo y estableceremos un rango de normalidad. Eventualmente podremos detectar alguna deficiencia de IgA.

#### EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

<p><b><u>Cada pareja:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Papel secante.</li> <li>- 3 tubos de ensayo de 5ml y gradilla.</li> <li>- 7 tubos Eppendorf.</li> <li>- Micropipetas para 10-100 µl y 200-1000 µl y sus puntas (amarillas y azules).</li> <li>- 2 módulos MaxiSorp de 8 pocillos y 1 marco.</li> <li>- 2 tubos Salivette® estériles (Sarstedt).</li> <li>- Tubo Eppendorf rotulado 10<sup>3</sup>: Patrón de referencia conteniendo 10<sup>3</sup> ng/ml de IgA.</li> <li>- Tubo de 50 ml rotulado <i>PBS-Tween</i>: PBS -0.05% v/v de Tween-20 (detergente no iónico).</li> <li>- Tubo de 10 ml rotulado <i>PBS-BSA</i>: contiene PBS con 1g/100 ml (=1% p/v) de albúmina bovina sérica (BSA).</li> <li>- Contenedor de residuos sólidos.</li> </ul>	<p><b><u>Cada mesa:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubo Eppendorf rotulado 400: Ac anti IgA humana obtenido en cabra y purificado por cromatografía de afinidad, a 400 µg/ml.</li> <li>- Tubo Eppendorf rotulado 0.8: Ac anti IgA humana conjugado a peroxidasa, a 0.8 µg/ml.</li> <li>- Tubo con tampón bicarbonato pH 9.6.</li> <li>- Tubo de 50 ml con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.</li> </ul> <p><b><u>Para todo el grupo:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubo de 50 ml con tampón citrato pH 5.5.</li> <li>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% v/v (guardado a 4°C).</li> <li>- 1,2 fenilendiamina (OPD), 1 comprimido de 20 mg (guardado a 4°C).</li> <li>- Centrífuga para tubos de 10 ml.</li> <li>- Espectrofotómetro para microplacas.</li> </ul>
--	---

#### PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

##### 1) Adsorción del Ac de captura (Ac anti IgA) al pocillo:

1.1. Rotular un tubo de ensayo “Ac de captura” y añadir los siguientes reactivos en el orden indicado:

REACTIVO \ TUBO	Ac de captura
Tampón bicarbonato pH 9.6	1625 µl
Ac anti IgA (400 µg/ml)	25 µl (agitar bien)

- 1.2. Ajustar dos tiras de 8 pocillos MaxiSorp a un marco blanco en las columnas 1 y 2. En cada pocillo pipetear 100  $\mu$ l del Ac de captura preparado (agitar antes el tubo).
- 1.3. Rotular en las solapas las iniciales de los alumnos y tapar con parafilm.
- 1.4. Incubar a 4°C de 12 a 72h.

**2) Recogida de saliva (Figura 3) :**

- 2.1. Cada alumno rotula un tubo Salivette estéril en la tapa y el lateral para identificarlo (si un estudiante no desea analizar su saliva, el profesor le proporcionará una congelada).
- 2.2. Extraer el tubo interior pequeño, quitar la tapa e introducir la torunda en la boca, mejor sin tocarla con los dedos.
- 2.3. Masticar sin apretar 1 minuto.
- 2.4. Retornar la torunda al tubo pequeño y tapar. Insertarlo en el tubo grande.
- 2.5. Centrifugar 3 minutos a 1000xg (equilibrar bien la centrífuga enfrentando los tubos).

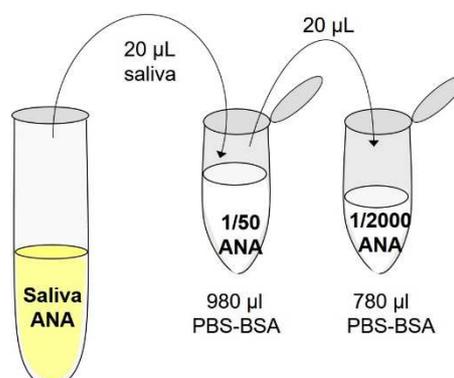


Figura 3. Utilización de los tubos Salivette®.

**3) Dilución de la saliva:**

- 3.1. Cada alumno rotula dos tubos eppendorf "1/50" y "1/2000", además de sus iniciales, y añade los siguientes reactivos en el orden indicado (es muy importante mezclar bien):

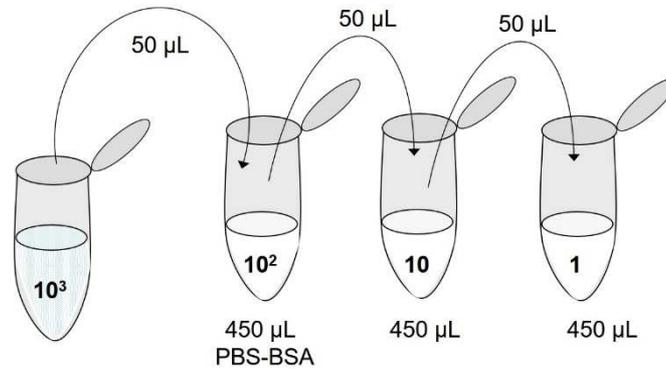
REACTIVO \ TUBO	Alu 1		Alu 2	
	1/50	1/2000	1/50	1/2000
PBS-BSA	980 $\mu$ l	780 $\mu$ l	980 $\mu$ l	780 $\mu$ l
Saliva del tubo Salivette	20 $\mu$ l (mezclar)	-	20 $\mu$ l (mezclar)	-
OJO: Del tubo eppendorf 1/50 bien mezclado	-	20 $\mu$ l (mezclar)	-	20 $\mu$ l (mezclar)



**4) Dilución seriada del patrón de referencia concentrado (10<sup>3</sup> ng/ml):**

- 4.1. Cada pareja rotula tres tubos eppendorf como se indica en la tabla y añade los reactivos en el orden indicado (es muy importante mezclar bien):

REACTIVO \ TUBO	10 <sup>2</sup> ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml
PBS-BSA	450 µl	450 µl	450 µl
Tubo 10 <sup>3</sup> ng/ml	50 µl (mezclar)	-	-
Tubo 10 <sup>2</sup> ng/ml	-	50 µl (mezclar)	-
Tubo 10 ng/ml	-	-	50 µl (mezclar)
Tubo 1 ng/ml	-	-	-



En este momento tendremos cuatro tubos patrón con 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10 y 1 ng/ml de IgA.

#### 5) Lavado de los pocillos con la primera capa:

En este paso se elimina el tampón y el exceso de Ac anti IgA que permanece en la fase líquida.

- 5.1. Sujetar firmemente el marco por su parte estrecha y decantar de un golpe sobre el recipiente de recogida de líquidos. Golpear varias veces sobre un secante para no dejar gotas en el interior de los pocillos.
- 5.2. Pipetear 250 µl de PBS-Tween en cada uno de los 16 ó 24 pocillos.
- 5.3. Repetir los dos pasos anteriores. En total, hay que pipetear 3 veces PBS-Tween y decantar 4 veces.
- 5.4. Finalizar golpeando los pocillos sobre el secante (el pocillo queda vacío, con una película de humedad, no debe secarse)

#### 6) Pipeteo de patrones y muestras:

- 6.1. En los pocillos lavados, pipetear 100 µl del patrón o muestra correspondiente según la plantilla inferior. Todo va por duplicado. En caso de pipetear en el pocillo erróneo, debe dejarse como está (no intentar lavar) y reorganizar la distribución sin olvidar reflejarlo en la plantilla inferior.

A	10 <sup>3</sup> ng/ml	10 <sup>3</sup> ng/ml
B	10 <sup>2</sup> ng/ml	10 <sup>2</sup> ng/ml
C	10 ng/ml	10 ng/ml
D	1 ng/ml	1 ng/ml
E	Alu 1 saliva 1/50	Alu 1 saliva 1/50
F	Alu 1 saliva 1/2000	Alu 1 saliva 1/2000
G	Alu 2 saliva 1/50	Alu 2 saliva 1/50
H	Alu 2 saliva 1/2000	Alu 2 saliva 1/2000
	1	2

6.2. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con unos segundos de agitación suave cada 5 minutos. Aprovechar esta incubación para preparar el reactivo siguiente.

**7) Preparación del Ac de detección (anti IgA conjugado a peroxidasa):**

7.1. Cada pareja rotula un tubo de ensayo limpio y prepara 1.7 ml de Ac de detección a concentración final 0.16 µg/ml. El Ac concentrado de partida está a 0.8 µg/ml y debe usar como diluyente PBS-BSA. Calcule y anote los las cantidades en la tabla antes de pipetearlas:

REACTIVO	TUBO	Ac de detección
PBS-BSA		.....
Ac anti IgA conjugado a peroxidasa (0.8 µg/ml)		.....

**8) Lavado de los pocillos:**

8.1. Al finalizar la incubación del paso 6, lavar los pocillos como en el paso (5), añadiendo, en total, cuatro veces PBS-Tween y decantando cinco veces.

**9) Pipeteo del Ac de detección:**

9.1. Sobre todos los pocillos lavados, pipetear 100 µl/pocillo del “Ac de detección” preparado anteriormente. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave cada 5 minutos. ALTERNATIVAMENTE: incubar hasta el día siguiente a 4° C.

**10) Preparación de la mezcla sustrato-cromógeno (para todo el grupo):**

10.1. En un tubo cónico graduado preparar una disolución que quede a 0.5 mg/ml final de 1,2 fenilendiamina y 0.05% v/v final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando como diluyente tampón citrato. La 1,2 fenilendiamina está prepesada en comprimidos de 20 mg (desprecie su volumen) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado está al 3% v/v. Todos los estudiantes deben realizar los cálculos:

REACTIVO	TUBO	Sustrato - Cromógeno
Comprimido de 1,2 fenilendiamina		20mg
Tampón citrato pH 5.5		.....
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% v/v (añadir cuando el comprimido esté disuelto)		.....

10.2. Repartir esta mezcla sustrato-cromógeno: 2ml/pareja en un tubo de ensayo limpio.

**11) Lavado de los pocillos:**

11.1. Al finalizar la incubación del paso 9, lavar los pocillos como en el paso (5), añadiendo, en total, 4 veces PBS-Tween y decantando 5 veces.

**12) Disparo de la reacción:**

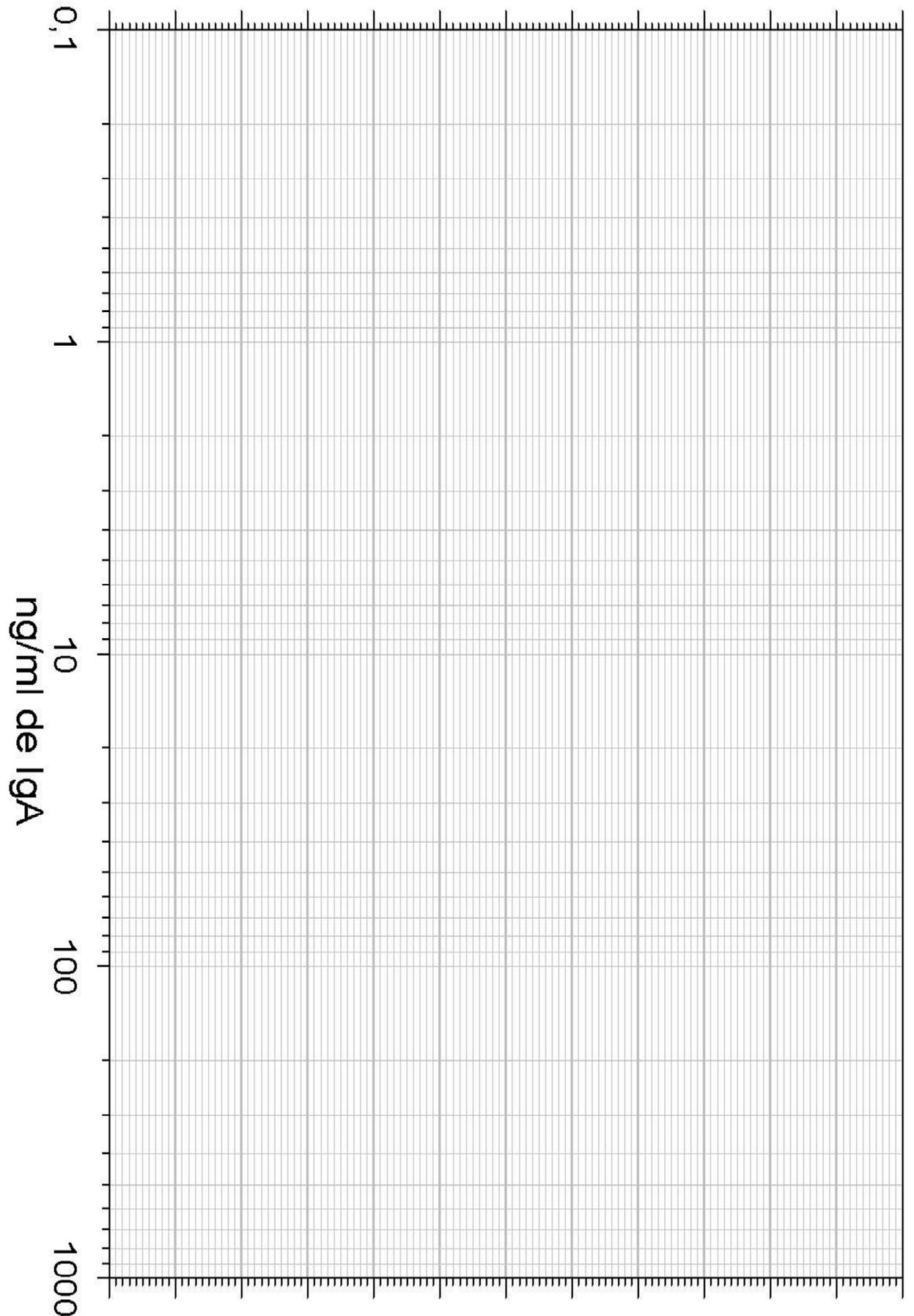
- 12.1. Pipetear 100 µl/pocillo de la mezcla sustrato-cromógeno preparada antes.
- 12.2. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 12.3. Detener la reacción con 100 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

### 13) Lectura y cálculos:

- 13.1. Agrupar las tiras de una mesa en mismo marco y leer absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas.
- 13.2. Calcular la media de los duplicados y representar *log ng/ml de IgA vs Absorbancia de los patrones* y unir los puntos. Puede utilizar el papel semilogarítmico adjunto (represente ng/ml en el eje log vs Absorbancia en lineal). Puede ajustar por mínimos cuadrados si ve que los cuatro puntos caen en el tramo recto de la gráfica.
- 13.3. Sobre la gráfica obtenida, interpolar las absorbancias de las muestras de saliva diluida de cada alumno de la pareja. Calcular la concentración en la muestra de saliva original teniendo en cuenta las diluciones empleadas (1/50 y 1/2000).

Para finalizar, recoja el lugar de trabajo, sin olvidar descartar los tubos usados al contenedor de desechos y completar el cuestionario que entrega el profesor.

# ABSORBANCIA



## MANUAL DE FLOWING PARA MICROAULA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

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

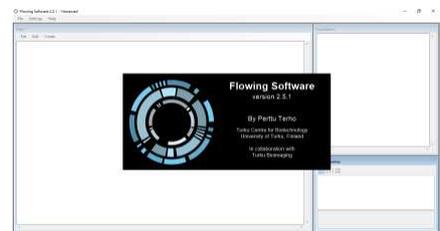
- Representar células en dot plots e histogramas.
- Seleccionar células por sus propiedades morfológicas mediante regiones.
- Establecer correctamente marcadores de umbral de fluorescencia.
- Analizar múltiples fluorescencias sobre las células de interés.
- Interpretar los resultados de la función Estadística.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

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:

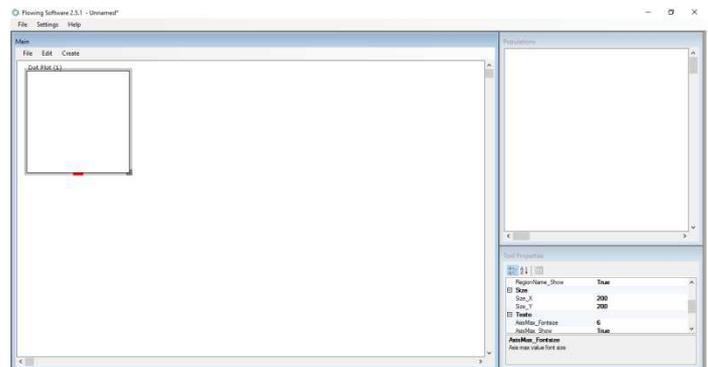
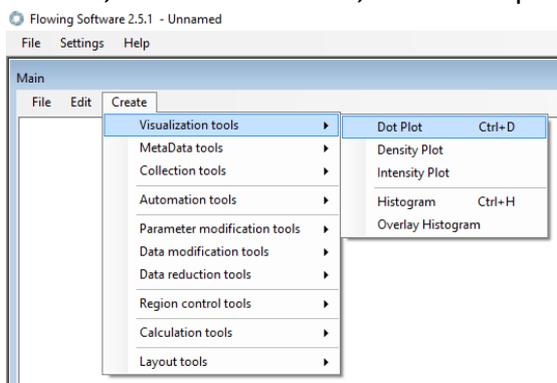
- a) Acceder a la versión instalada en las ALAS Merla (Aulario General), Marabú y Mirasol (Facultad de Medicina).
- b) Descargarlo en su ordenador de <http://www.flowingsoftware.com/> o de <http://www.uskonaskel.fi/flowingsoftware/> (aquí también encontrará un video tutorial).

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.



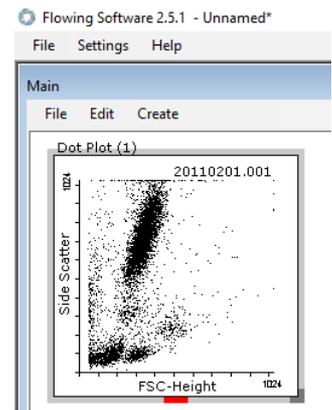
- 2) Representación mediante dot plot. En la ventana más grande, denominada *Main*, seleccione *Create, Visualization tools, Dot Plot*. Aparecerá una ventana vacía:



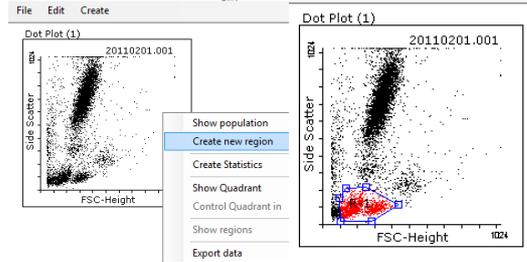
3) Abra ahora el archivo de datos a analizar: *File, Open FCS* y seleccione 20110201.001 que ha descargado antes del aula virtual y pulsar Abrir.

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.

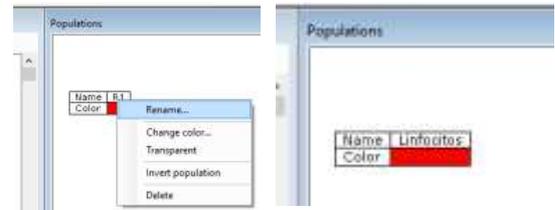
Abajo a la derecha de su pantalla verá el recuadro *Tool Properties* que le permitirá cambiar algunas propiedades visuales de esta ventana o de la que en su momento tenga seleccionada.



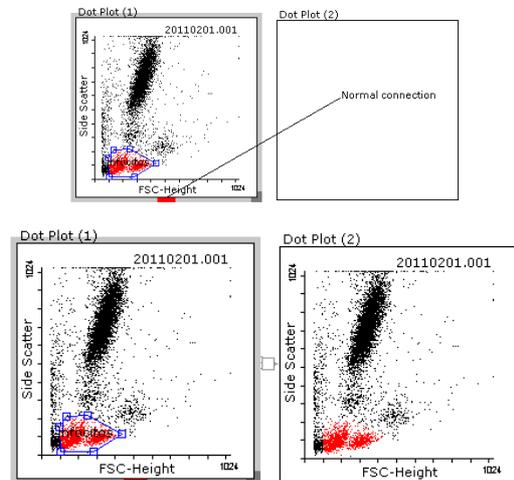
4) Para seleccionar las células de interés (en primera instancia linfocitos): pulse con el botón secundario sobre el dot plot y seleccione *Create new region*. Ahora clique con el botón principal sobre el dot plot y "pinte" con clics y trazos un polígono (región) que englobe los linfocitos y que debe 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.



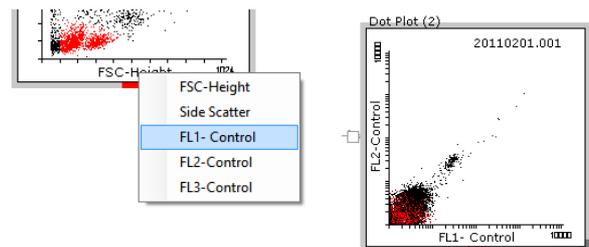
5) Si necesita **borrar la región** y hacerla de nuevo, o para **cambiar el color o el nombre**, utilice la ventana *Populations* a la derecha de su pantalla y el botón secundario del ratón. En este caso cambiaremos "R-1" por "Linfocitos".



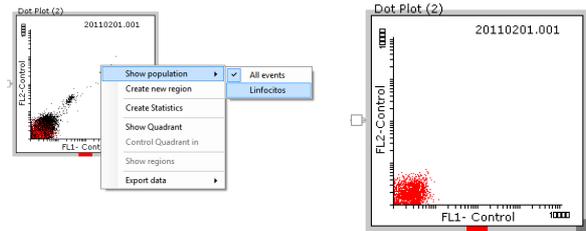
6) Cree un segundo dot plot como en el paso 2 y mueva la ventana vacía a la derecha del primero. Ahora conéctelos, para ello seleccione con el botón principal el primer dot plot (aparece rodeado por un marco gris) y sitúe el puntero sobre el segmento rojo inferior. Trace con el botón principal una línea 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.



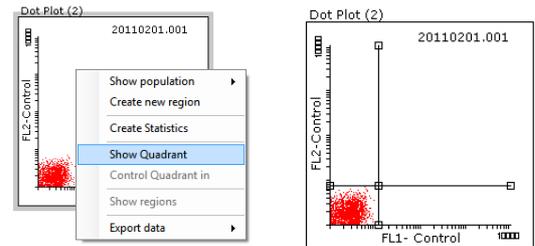
7) El nuevo dot plot muestra *FSC vs Side Scatter* por defecto. Cambie estos parámetros clicando sobre cada uno de ellos con el botón secundario y seleccione *FL1 vs FL2*. Fíjese que los linfocitos siguen apareciendo de rojo.



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).



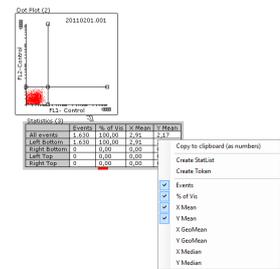
9) Para colocar los cuadrantes: clique sobre el dot plot con el secundario y seleccione *Show Quadrant*. Clicando en el punto de cruce y moviendo puede ajustarlos para delimitar bien el fondo, dejando todas o la mayoría de las células en el cuadrante inferior izquierdo, como se muestra a la derecha.



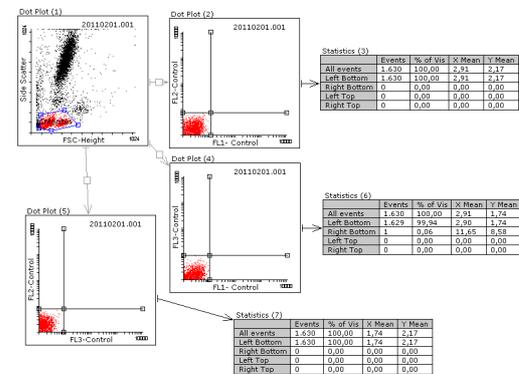
10) Determine cuántas células hay en cada cuadrante mediante la función Estadística: pulse sobre el dot plot con el secundario y seleccione *Create Statistics*.

Para eliminar información innecesaria de la tabla de datos clique sobre ella y deje únicamente las cuatro primeras opciones.

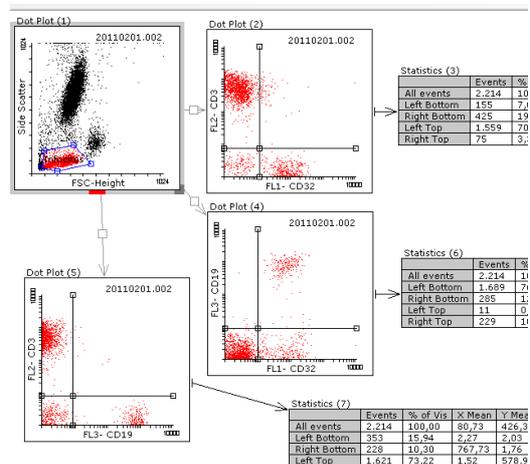
Fíjese que ahora cualquier cambio que haga en el dot plot principal, p.ej. modificar la forma de la región, se verá en el segundo y en la estadística.



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.

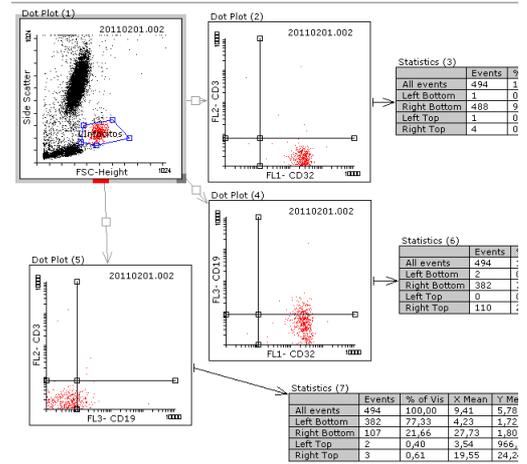


12) Ahora analice el fichero 20110201.002, para ello seleccione con un clic el dot plot principal y pulse *File, Next file in directory*. Aparecerán representados todos los parámetros de este fichero, con sus respectivas estadísticas, tal y como se muestra a la derecha. Repitiendo esta sencilla operación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



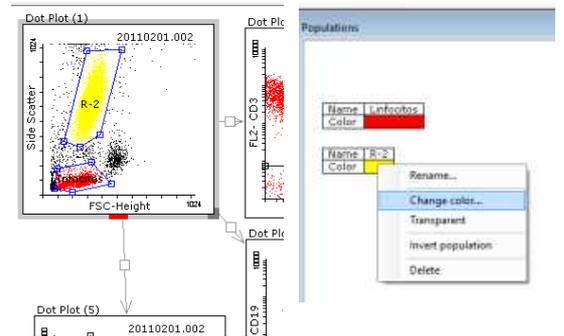
13) Actualización de la región: si selecciona el dot plot principal y mueve la región, p.ej. para recoger algunos linfocitos que hayan quedado fuera, verá que los demás dot plots y sus estadísticas se actualizan. Compruébelo llevando la región directamente sobre los monocitos.

(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...*)

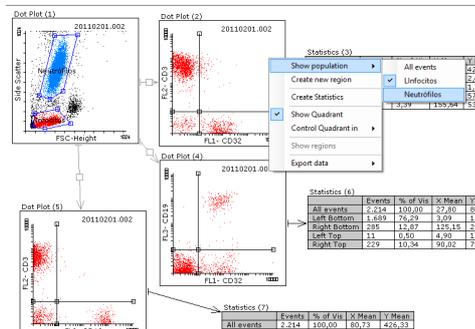


14) Coloque la región de nuevo en linfocitos y cree ahora una para neutrófilos: seleccione el dot plot principal y clique con el secundario *Create new region*. Siga los pasos del apartado 4).

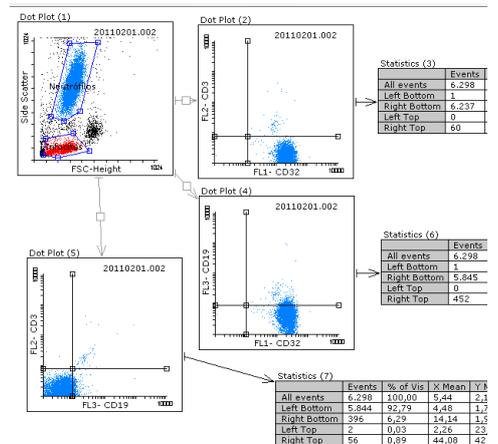
En la ventana *Populations* cambie "R-2" por "Neutrófilos" y cambie el color amarillo que aparece por defecto por el azul. En caso de superposición de regiones, las células adquieren el color de la última región trazada.



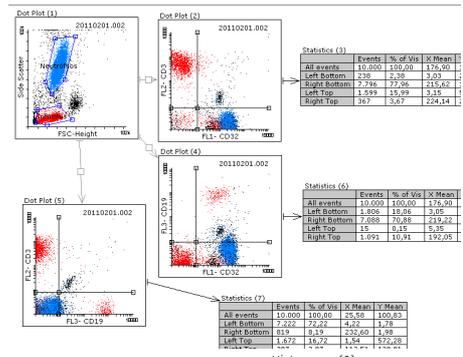
15) En cada uno de los dot plots secundarios clique *Show population, Neutrófilos*. Aparecerá el análisis de cada parámetro en los neutrófilos.



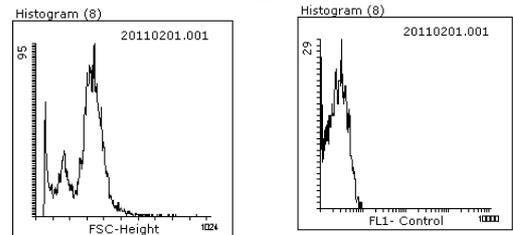
Observe que el fondo de fluorescencia puede ser mayor que el de los linfocitos y necesite reposicionar los cuadrantes retrocediendo al file *20110201.001*



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.

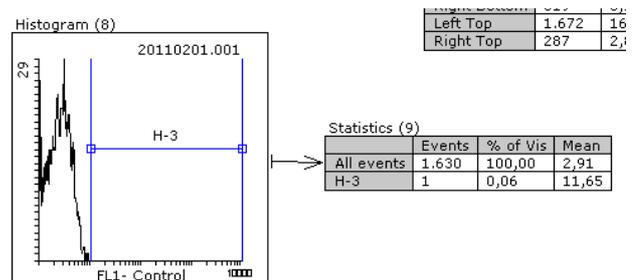


17) Representación mediante histogramas. Para crear un histograma, en la ventana *Main* pulse *Create, Visualization tools, Histogram*. Mueva la nueva ventana a la parte de debajo de la pantalla y seleccione el archivo de datos a analizar: *File, Open FCS, 20110201.001* y pulsar Abrir. Por defecto representará 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.

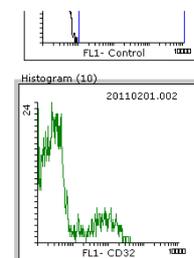


18) En la ventana *Tool properties* de la derecha puede cambiar los atributos de este histograma, como su color de relleno. Para cambiar la escala del eje Y, clique con el secundario sobre el valor numérico que aparece en el eje y cambie automático por *Custom Y-scale*.

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).



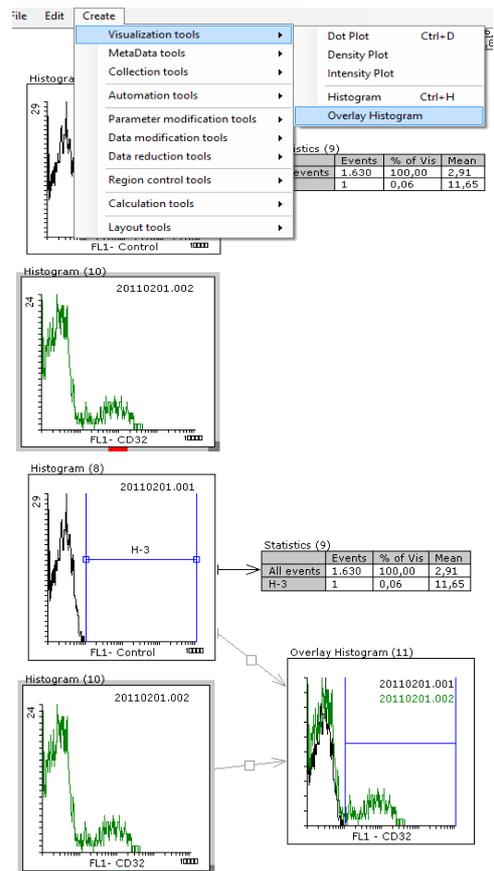
20) Cree otro histograma debajo y muestre el siguiente archivo (*20110201.002*). Seleccione linfocitos y el parámetro FL1. En la ventana *Tool properties* cámbiele el color de línea al verde.



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

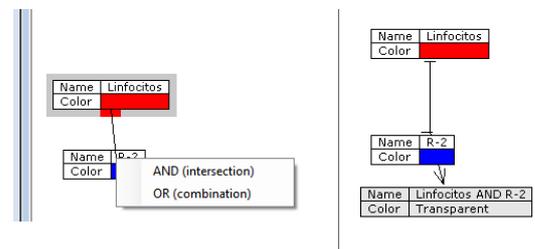
Si no tienen el mismo texto en el título del eje X debe ponérselo manualmente a la superposición, para ello seleccione esta nueva ventana, clique el secundario, *Use custom axis title* y ponga el título correspondiente, en este caso FL1 CD32. Verá que aparecen ambos histogramas en la misma ventana, de 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.

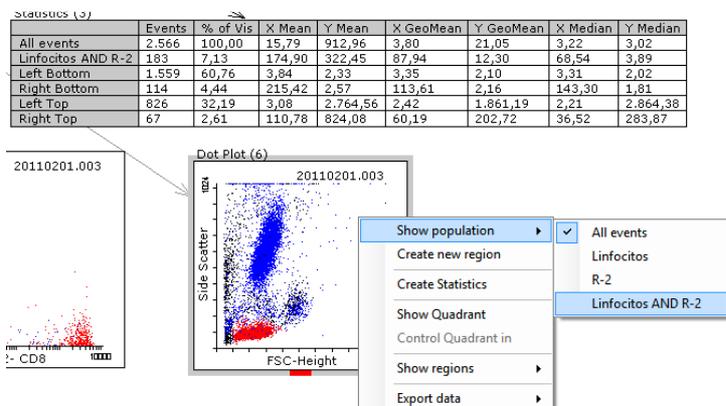


22) Para combinar regiones de manera lógica (AND / OR): conecte las regiones de interés en la ventana *Populations* y especifique AND u OR.

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-?*