

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Facultad de Biología

Estudio de la estabilidad de la combinación de anticuerpos de los tubos TCD4 y TCD8 para su uso en el estudio de la monitorización del sistema inmune mediante técnicas de citometría de flujo multiparamétrica

Analysis of antibody cocktail stability for CD4 and CD8 T-lymphocyte populations study in immune monitoring studies by multiparametric flow cytometry techniques



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Joel Pablos Martín

SALAMANCA, JUNIO 2021

RESUMEN

Introducción: El reactivo *Brilliant Stain Buffer* (BSB), diseñado para reducir artefactos en ensayos de citometría de flujo (CMF), causados por interacciones entre fluorocromos conjugados a anticuerpos monoclonales, podría conferir mayor estabilidad a los fluorocromos, y facilitar la preparación técnica e interpretación de resultados.

Objetivos: Evaluar la estabilidad de los cócteles de anticuerpos preparados con antelación, para el análisis de poblaciones leucocitarias en sangre periférica (SP) por CMF y el beneficio potencial del BSB para preservar el cóctel en el tiempo.

Métodos: Se procesaron muestras de SP por CMF utilizando dos paneles (TCD4 y TCD8) con y sin BSB, utilizando los cócteles preparados el día de su uso, 24h y 5 días antes de su uso. La estabilidad de los anticuerpos se comparó mediante el *Stain Index* (SI).

Resultados: Se observó cierta variabilidad en la estabilidad de algunos fluorocromos con el paso del tiempo, principalmente en el panel TCD8, aunque el SI no varió sustancialmente (vs control sin BSB). En general, no había diferencias entre los tubos con y sin BSB.

Conclusiones: La antigüedad del cóctel pre-preparado de anticuerpos no perjudica la estabilidad del cóctel y el uso de BSB no parece afectar de forma negativa a la estabilidad del cóctel.

PALABRAS CLAVE: citometría de flujo, *Brilliant Stain Buffer*, monitorización inmune, estabilidad, anticuerpos, *Stain Index*.

ABSTRACT

Introduction: The use of the Brilliant Stain Buffer (BSB) reagent, designed to reduce artifacts in multiparametric flow cytometry (MFC) assays caused by interactions between antibody-conjugated fluorochromes, would contribute to the stability of fluorochromes, and therefore would ease technical preparation and interpretation of results.

Objectives: To evaluate the stability of antibody cocktails for the analysis of leukocyte populations in peripheral blood (PB) by MFC and the potential benefit of BSB to preserve the cocktail over time.

Methods: PB samples were analysed by MFC using two antibody panels (TCD4 and TCD8) with and without BSB, using cocktails prepared on the day of processing samples, and 24 hours and 5 days before using. The stability of the antibodies was analysed by comparing the Stain Index (SI) of the different assays.

Results: Some degree of variability was observed in the over-time stability of certain fluorochromes, mainly in the TCD8 panel, although in general SI was not negatively affected. Overall, there were no differences between tubes with and without BSB.

Conclusions: The age of the cocktail does not affect the stability of the cocktail, and the use of BSB does not negatively impact on such stability.

KEY WORDS: flow cytometry, Brilliant Stain Buffer, immune monitoring, stability, antibodies, Stain Index.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN..... 5

2. HIPÓTESIS..... 8

3. OBJETIVOS..... 8

3.1. OBJETIVO GENERAL..... 8

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 8

4. MATERIALES Y MÉTODOS..... 9

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL 9

4.2. MUESTRAS..... 11

4.3. ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA..... 11

4.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS 13

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 16

5.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE BSB EN LA ESTABILIDAD DE LA COMBINACIÓN DE ANTICUERPOS PREPARADOS EN EL MISMO DÍA DE SU UTILIZACIÓN 16

5.2. EFECTO DE LA ANTIGÜEDAD DEL CÓCTEL DE ANTICUERPOS EN LA ESTABILIDAD DE LOS ANTICUERPOS CONJUGADOS CON FLUOROCROMOS 18

5.3. EFECTO DEL REACTIVO BSB EN LA ESTABILIDAD DE LOS ANTICUERPOS MARCADOS CON FLUOROCROMOS TRAS EL PASO DEL TIEMPO 21

6. CONCLUSIONES 23

7. AGRADECIMIENTOS..... 24

8. REFERENCIAS 25

9. ANEXOS..... 27

9.1. ANEXO I. REACTIVOS Y SOLUCIONES 27

1. INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo multiparamétrica (CMF) es una técnica que mide múltiples características físicas y biológicas de forma simultánea de partículas u otros componentes (p.ej. células) a nivel individual, presentes en una suspensión líquida. El fundamento de la técnica radica en medir la dispersión lumínica (*light scattering*) y la intensidad de la emisión de luz de moléculas fluorescentes, que ocurre cuando la luz de una fuente de excitación (haz de luz láser) incide sobre partículas que pasan una a una, a través de un flujo acuoso continuo. Para ello, los citómetros de flujo están dotados de un sistema de flujo acoplado a un sistema óptico compuesto por láseres como fuente de luz, y un sistema de filtros, espejos y detectores^{1,2}.

A modo de resumen, el sistema de flujo está compuesto de un canal por el cual circula un fluido (tampón salino) a velocidad constante y homogénea. El sistema de flujo se comporta como una vaina a través de la cual se inyecta la muestra en suspensión a analizar, la cual pasará también de forma constante y homogénea, haciendo que las partículas en suspensión circulen lo suficientemente separadas unas de las otras, permitiendo así su identificación y análisis a nivel individual por el componente óptico del citómetro; a medida que las partículas pasan por el componente óptico, la luz láser que incide sobre cada partícula, se desvía alrededor de los bordes de las mismas resultando en la dispersión de la luz, que será recogida por detectores. De esta forma, se produce un tipo de dispersión de luz frontal (*forward scatter*, FSC) cuya medida es proporcional al tamaño de la partícula, y otro de dispersión lateral (*side scatter*, SSC), que aporta información acerca de la complejidad interna (“granularidad”) de la misma^{1,2}. Además de estos 2 parámetros que dependen de las propiedades físicas de las partículas, la CMF permite estudiar las propiedades inmunofenotípicas de las mismas (típicamente en el caso de células u otros componentes de una muestra biológica) mediante el uso de proteínas (anticuerpos) conjugadas con moléculas fluorescentes (fluorocromos)¹, que al ser excitadas por la energía de la luz láser (a una longitud de onda específica para cada fluorocromo), emiten luz (en un espectro de emisión también característico para cada fluorocromo) que es recogida por el sistema óptico de los citómetros^{3,4}; la emisión de fluorescencia proveniente de un anticuerpo conjugado es proporcional a la cantidad de antígeno (proteína de membrana, citoplasmática o nuclear a la cual se une el anticuerpo de forma específica) presente en cada célula, y por tanto permite medir la expresión diferencial de los mismos mediante la cuantificación de la intensidad media de emisión fluorescente^{1,2}. De esta forma, es posible medir de forma simultánea múltiples parámetros distintos (> 40 con los citómetros de última generación), entre ellos el tamaño y la complejidad, junto con las características inmunológicas de interés, permitiendo así la

identificación, cuantificación y caracterización inmunofenotípica de distintas poblaciones celulares coexistentes en una muestra (p.ej. poblaciones leucocitarias en sangre)^{2,5}. En vista de esto, no es de extrañar la amplia utilidad de la CMF en el ámbito de la biomedicina, siendo extensamente aplicada para el diagnóstico de pacientes con enfermedades hematológicas (p.ej. leucemias y linfomas) y su seguimiento tras el tratamiento (p.ej. determinación de la enfermedad mínima residual)^{4,6-8}, así como en investigación. En este sentido, en el marco del programa europeo PERISCOPE (*PERTussIS Correlates of Protection Europe*) se han desarrollado 4 combinaciones de anticuerpos (13-19 anticuerpos conjugados con fluorocromos en 14 colores/fluorescencias) para la identificación de >250 subpoblaciones inmunes de la sangre (células inmunes innatas, B, T y *Natural Killer* (NK)) mediante CMF, con el fin de estudiar la inmunidad frente a la infección y vacunación contra la tos ferina en humanos^{9,10}. El desarrollo y estandarización de esta metodología, ha permitido además el estudio y monitorización del sistema inmune en un amplio espectro de condiciones patológicas – mastocitosis, mieloma múltiple, leucemia linfática crónica, cáncer de páncreas, inmunodeficiencias, pacientes sometidos a terapia con células CAR-T, linfomas T periféricos, linfocitosis monoclonal de células B y COVID-19, entre otras¹¹⁻¹⁷–, aumentando de forma notable el conocimiento de los patrones de alteración de las poblaciones inmunitarias circulantes en sangre en dichos modelos de estudio.

Sin embargo, con el aumento en el número de marcadores (anticuerpos) utilizados en una misma combinación (panel), también aumenta la complejidad técnica y analítica de los estudios por CMF. Dentro de las limitaciones analíticas, destacan la dificultad en la discriminación de los patrones de emisión proveniente de aquellos anticuerpos usados de forma simultánea y que son excitados con un mismo láser y/o de fluorocromos que presenten un espectro de emisión similar; como consecuencia, el detector de un fluorocromo recibirá también la emisión de otro/s fluorocromos distintos contaminando las mediciones en los detectores individuales¹⁸. Estos efectos no deseados son cuantificables y se puede solventar matemáticamente mediante la compensación de la intensidad de la señal recogida en cada canal^{3,18}. Además, a la complejidad analítica asociada al uso simultáneo de un amplio número de fluorocromos en los estudios por CMF, se añade la dificultad asociada a las posibles interacciones entre las moléculas fluorescentes conjugadas a los anticuerpos, que pueden generar artefactos indeseados como marcajes inespecíficos y/o el solapamiento de los patrones de emisión de distintos fluorocromos; para solucionar este problema, se ha desarrollado un reactivo, conocido como *Brilliant Stain Buffer* (BSB) (BD Biosciences, San José, CA, EEUU)¹⁹, para marcajes celulares en los que se empleen dos o más fluorocromos de tipo *BD Horizon Brilliant™* y que facilita

la resolución de los picos de emisión, y por ende el aislamiento de las poblaciones leucocitarias durante el análisis de los resultados obtenidos mediante CMF.

A las limitaciones antes mencionadas, se le añade los potenciales errores humanos que puedan ocurrir durante la preparación de la mezcla (cóctel) de anticuerpos (errores de pipeteo), así como el tiempo necesario que se requiere para esta etapa, especialmente cuando se estudia un amplio panel de marcadores y el volumen en el número de muestras a analizar es elevado. En este sentido, la posibilidad de preparar el total de los cócteles de anticuerpos necesarios para usar durante un período de tiempo (p.ej. los 5 días laborables de una semana) previamente a los ensayos de CMF, en lugar de mezclar todos los anticuerpos uno a uno para cada muestra, facilitaría enormemente el funcionamiento de un laboratorio especializado en la técnica, en el que volumen de muestras estudiadas a diario es muy elevado. Sin embargo, la estabilidad de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos puede verse afectada con el paso del tiempo, especialmente la de los fluorocromos que son en realidad un tándem, debido a la pérdida de intensidad de emisión y las interacciones entre ellos, problema que podría resolverse con el uso de determinados reactivos (p.ej. BSB) que estabilicen los fluorocromos del cóctel de anticuerpos.

2. HIPÓTESIS

La utilización del reactivo comercial BSB, diseñado específicamente para reducir los posibles artefactos en el marcaje durante los estudios de CMF que puedan ser causados por las interacciones entre distintos fluorocromos de tipo “*Brilliant Violet*” en una combinación de anticuerpos, podría contribuir a mejorar la estabilidad de los mismos y optimizar la resolución de los picos de emisión de los distintos fluorocromos, facilitando la preparación técnica de los cócteles y la interpretación de la información obtenida de dichos experimentos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

En el presente Trabajo de Fin de Grado, tenemos por objetivo evaluar el efecto del uso del reactivo BSB en la estabilidad de la combinación de anticuerpos para el análisis de la monitorización inmune de las poblaciones linfocitarias T de la sangre periférica (SP) por CMF, y su impacto en la discriminación de las poblaciones celulares durante el análisis. Para llegar a este fin, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

3.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad de discriminación de las poblaciones leucocitarias de la SP en el análisis por CMF con el uso el reactivo BSB.
2. Determinar la estabilidad del cóctel de anticuerpos de los paneles TCD4 y TCD8 en el tiempo (hasta 5 días), comparando este parámetro con los resultados obtenidos mediante el uso de BSB.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Para poder evaluar el potencial uso del reactivo BSB en la optimización de la estabilidad de los cócteles de anticuerpos a lo largo del tiempo y, por ende, el análisis de los resultados obtenidos mediante CMF, nos planteamos el diseño experimental detallado a continuación en la **Figura 1**:

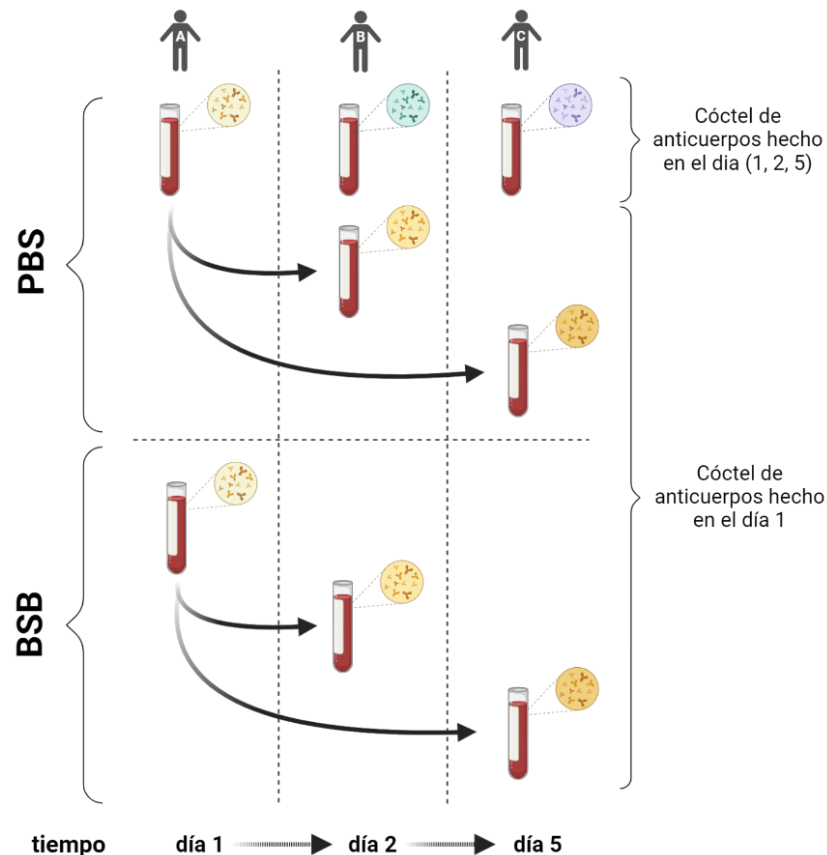


Figura 1. Diagrama del diseño experimental del estudio. El día 1 del estudio se prepararon dos mezclas (cóctel) de anticuerpos por panel (TCD4 y TCD8), en cantidad suficiente para 3 ensayos distintos (día 1, 2 y 5), una de ellas en conjunto con tampón BSB (*panel inferior*) y otra sin BSB (PBS en sustitución, *panel superior*). Cada uno de estos cócteles se utilizaron sobre una muestra distinta, recogida cada día: a día 1 (sujeto A), día 2 (sujeto B) y día 5 (sujeto C). En paralelo, en el día 2 y 5 se preparó un cóctel de anticuerpos “en fresco” (montado ese mismo día), de forma tal que sirviera de control en cada punto. PBS, *Phosphate Buffer Saline*; BSB, *Brilliant Stain Buffer*. Imagen creada con BioRender.com (2021) (<https://biorender.com/>).

En el primer día del experimento (día 1), se prepararon dos cócteles de anticuerpos (uno correspondiente al panel TCD4 y otro al panel TCD8, **Tabla 1**) en un volumen suficiente para 6 ensayos, y que son posteriormente divididos en 12 tubos (en total) para su uso en 3 días distintos (día 1, 2 y 5 del experimento); a la mitad de las preparaciones (3 tubos por cada panel) se agregaron 50 μL /tubo de tampón salino de uso habitual en ensayos de CMF (*Phosphate Buffer Saline* – PBS – Na^+/K^+ 1X) mientras que en los 3 tubos restantes se reemplazó el PBS por 50 μL de BSB.

Una vez preparados los reactivos, a continuación, se realizaron los ensayos de CMF correspondientes al día 1, utilizando 2 cócteles de anticuerpos/panel a estudiar (TCD4 y TCD8) preparados “en fresco” (< 24h), uno diluido en PBS y otro en BSB; de esta forma pudimos evaluar el efecto del reactivo BSB en el análisis al compararlo con las muestras de SP control (PBS). Posteriormente, al día siguiente (día 2 del experimento) y en el día 5, se repitieron los experimentos del día 1, esta vez, utilizando cócteles almacenados en oscuridad y a 4°C durante 24 h y 4 días (todos preparados el día 1), respectivamente, para evaluar la estabilidad en el tiempo de dicho cóctel de anticuerpos tras 1 y 4 días de haber sido preparado.

Con el fin de evitar la variabilidad y los artefactos debidos al uso de muestras envejecidas (ensayadas en >24 h tras la extracción de la muestra) cada día se realizaron los ensayos de CMF utilizando muestras de SP de donantes adultos sanos extraídas en <24 h hasta su procesamiento; por este motivo, al diseño experimental detallado anteriormente, añadimos dos ensayos a modo de control (uno para el panel TCD4 y otro para TCD8) en los que utilizamos cócteles de anticuerpos preparados “en fresco” y diluidos en PBS, además de los ya detallados para los días 2 y 5; de este modo, las muestras que se compararon entre sí en el análisis tenían el mismo tiempo tras su extracción, eliminando así variables de confusión de nuestro experimento.

Tabla 1. Panel de anticuerpos de los tubos TCD4 y TCD8 para la monitorización inmune en sangre.

Combinación de anticuerpos conjugados con fluorescencia de los tubos TCD4 (*izquierda*) y TCD8 (*derecha*), diseñados, desarrollados y estandarizados por el consorcio europeo EuroFlow^{12,23,24} para el estudio de la monitorización del sistema inmune, específicamente de las subpoblaciones circulantes en sangre de linfocitos T.

Panel del tubo TCD4		Panel del tubo TCD8	
Anticuerpo	Fluorocromo	Anticuerpo	Fluorocromo
CD27	BV421	CD27	BV421
CD45RA	BV510	CD45RA	BV510
cyCD154*	BV605	cyCD154*	BV605
CD62L	BV650	CD62L	BV650
CD127	BV711	CD16	BV711
CD3	BV786	CD3	BV786
CD25	VioBright FITC	CD57	FITC
CCR10	PerCPCy5.5	CD28	PerCPCy5.5
CD183 (CXCR3)	PE	Granzima B*	PE
CD196 (CCR6)	PECF594	CD8	PE CF594
CD194 (CCR4)	PECy7	TCRγδ	PECy7
CD185 (CXCR5)	APC	CD45	AF700
CD45	AF700	CD56	APC-Vio770
CD4	APCH7		

Todos los anticuerpos se emplean para marcaje de membrana, excepto aquellos marcados con un asterisco, que se utilizan para marcaje intracitoplasmático (*).

4.2. Muestras

Para el estudio planteado, se han utilizado muestras de SP obtenidas de tres donantes adultos sanos anónimos provenientes del Centro de Hemodonación de Castilla y León (Valladolid), que fueron extraídas en 3 días distintos: día 1 (voluntario A), día 2 (voluntario B) y día 5 (voluntario C) (Figura 1). En los 3 casos, las muestras fueron recogidas en tubos con EDTA como anticoagulante y procesadas para su estudio en <24 h tras su extracción.

4.3. Ensayos de citometría de flujo multiparamétrica

El procesamiento y preparación de las muestras de SP para su estudio por CMF, fue realizado de acuerdo con los protocolos desarrollados por el consorcio europeo *EuroFlow*^{20,21}, y que se esquematiza en la Figura 2. En este caso, para el estudio de los paneles TCD4 y TCD8, utilizamos el protocolo de “*Fix & Perm*” que permite el análisis simultáneo de marcadores expresados a nivel de la membrana plasmática y del citoplasma celular; mediante el mismo se consigue, además de la unión específica de anticuerpos a la membrana plasmática de los leucocitos, la creación de poros en la membrana celular que permite la entrada de los anticuerpos al interior de la célula y su posterior unión específica a los antígenos correspondientes expresados en el citoplasma.

Protocolo de “*Fix & Perm*” (“Fijación y Permeabilización”).

- 1) *Montaje de los cócteles de anticuerpos*: se realiza la mezcla de anticuerpos para el marcaje de membrana correspondientes a cada panel de marcadores a estudiar (Tabla 1), siguiendo los volúmenes de reactivos a usar previamente establecidos por *EuroFlow*²².
- 2) *Marcaje de la muestra e incubación de los anticuerpos (30 min)*: A continuación, se agregan entre 100-150 μ L de SP (según el recuento leucocitario de la muestra, de forma tal de procesar aproximadamente 10^6 células) a cada cóctel preparado (anticuerpos para el marcaje de membrana); se homogeniza la muestra con los anticuerpos en vórtex durante 1-3 segundos y se deja incubar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (T.A), para que los anticuerpos se unan a los antígenos de la membrana celular de los leucocitos de la SP.
- 3) *Lavado y centrifugación*: una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realiza un lavado de la muestra marcada con los anticuerpos con el fin de eliminar el exceso de anticuerpos no unidos o unidos de forma inespecífica y la eliminación de restos celulares. Para ello se resuspende la mezcla en 2 mL de PBS/BSA, se mezcla en el vórtex (1-2 s) y se centrifuga (T.A) durante 5 min a 540 g.

- 4) *Fijación de la membrana celular*: se desecha el sobrenadante dejando 100 μL aproximadamente de botón celular, se resuspende en 100-150 μL (según el volumen de muestra utilizado) de solución fijadora de membrana (solución A; Cytognos, Salamanca, España), se agita en el vórtex (1-2 s) y se incuba durante 15 min en oscuridad a T.A. Con este paso, se consigue mantener las estructuras celulares lo más intactas posible reduciendo al máximo la pérdida de leucocitos durante la etapa de permeabilización (ver paso 6), y por ende manteniendo la integridad celular.
- 5) *Lavado y centrifugado*: para el lavado de la solución de fijación, se resuspende la mezcla en 2 mL PBS/BSA, se agita en vórtex (1-2 s) y se centrifuga de nuevo (540 g, 5 min, T.A.).
- 6) *Permeabilización de la membrana celular y marcaje con anticuerpos citoplasmáticos*: luego de la centrifugación, se remueve el sobrenadante dejando 100 μL de botón celular, que se resuspende en 100 μL de la solución permeabilizante de membrana (solución B, Cytognos); con este paso se crean poros en la membrana celular que servirán posteriormente para la penetración de los anticuerpos citoplasmáticos en la célula. Inmediatamente después, se prosigue añadiendo los anticuerpos citoplasmáticos (Tabla 1), se agita en vórtex (1-2 s) y se deja incubar por 15 min en oscuridad a T.A, mientras que los anticuerpos se unen a antígenos intracitoplasmáticos.
- 7) *Lavado y centrifugado*: luego de finalizar el marcaje citoplasmático, para lavar la solución de permeabilización y concentrar la muestra, se resuspende la mezcla en 2 mL de PBS/BSA, se homogeneiza en vórtex (1-2 s) y se centrifuga una última vez (540 g, 5 min, T.A). Una vez finalizada la centrifugación se retira el sobrenadante dejando aproximadamente 200 μL de botón celular y se agregan 2-3 gotas de PBS 1X.
- 8) *Adquisición de la muestra en el citómetro de flujo*: inmediatamente después de finalizado el protocolo de procesamiento y marcaje de la muestra, se adquieren las células marcadas con anticuerpos en el citómetro de 14 colores LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences).

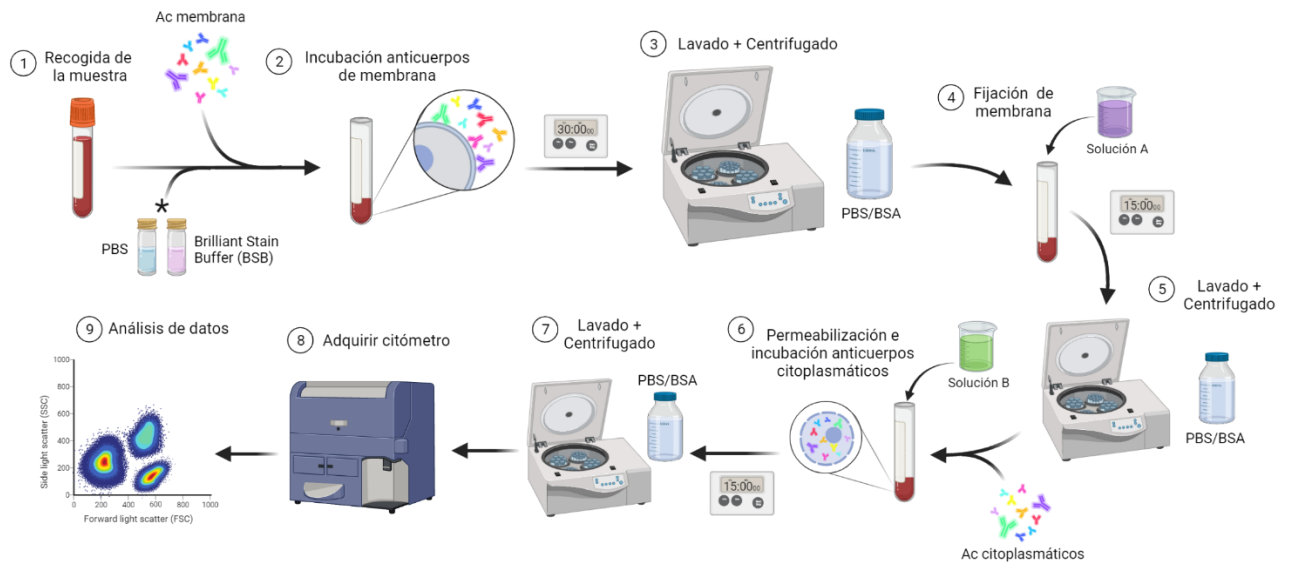
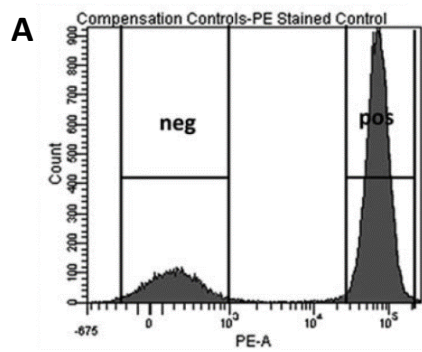


Figura 2. Esquema del protocolo de CMF utilizado para el marcaje simultáneo con anticuerpos de membrana y citoplasmáticos (protocolo *Fix & Perm*). (1) Preparación del cóctel de anticuerpos marcados con fluorescencia, *buffer* (*BSB o PBS) y mezcla con muestra (SP); (2) incubación de la mezcla (30 min); (3) lavado; (4) tratamiento con solución fijadora de membrana (15 min); (5) lavado; (6) tratamiento de permeabilización (15 min); (7) lavado; (8) adquisición de la muestra marcada con anticuerpos en citómetro de flujo de >14 colores; y (9) análisis de los datos. Imagen creada con BioRender.com (2021) (<https://biorender.com/>).

4.4. Análisis de los resultados

Para evaluar la resolución de los picos de emisión de fluorescencia se realizó el cálculo del *Stain Index* (SI) de cada anticuerpo conjugado con fluorescencia empleado en los paneles TCD4 y TCD8; mediante este cálculo se normaliza la intensidad relativa de una señal de fluorescencia positiva con aquella procedente de una señal fluorescente no específica (ruido)²³, siguiendo la ecuación que aparece en la [Figura 3, panel B](#). Para ello, para cada anticuerpo estudiado, se mide la media de intensidad de fluorescencia (MIF) proveniente de una población celular que expresa significativamente el antígeno contra dicho anticuerpo (población control positiva), que se normalizará con la MIF de otra población que no lo expresa (población control negativa) ([Tabla 3 y 4](#)) y, además, tiene en cuenta la dispersión de la expresión en la población negativa. De esta manera, el SI aporta información acerca de la resolución de los picos de emisión de fluorescencia para cada anticuerpo conjugado ([Figura 3, panel A](#)), y por tanto proporciona una medida de la resolución con la que un determinado marcador fluorescente permite la identificación de la población celular.

De esta forma, se han comparado los valores de SI de cada anticuerpo conjugado con un fluorocromo de la siguiente manera ([Tabla 2](#)): i) para la evaluación del efecto del BSB en la estabilidad del cóctel de anticuerpos comparamos los valores de SI obtenidos en los experimentos del



B

Stain Index (SI)

$$SI = \frac{MFI_{\text{población positiva}} - MFI_{\text{población negativa}}}{2 \times SD_{(MIF)} \text{ población negativa}}$$

Figura 3. Cálculo del Stain Index (SI). El SI mide la separación de picos positivos y negativos en el citómetro de flujo basándose en la fórmula mostrada a la derecha; (A) se ejemplifica los picos de emisión un anticuerpo conjugado con el fluorocromo ficoeritrina (PE) en una población control negativa (*izquierda*) y otra positiva (*derecha*); (B) fórmula matemática para el cálculo del SI. MFI: intensidad media de fluorescencia; SD: desviación estándar ²⁴.

día 1 (día 1 PBS vs día 1 BSB) (Figura 1); ii) para la evaluación de la estabilidad de los fluorocromos a lo largo del tiempo, los valores calculados de SI de los cócteles diluidos en PBS y almacenados durante 24 h (día 2) y 4 días (día 5) se compararon con los obtenidos de los ensayos utilizando cócteles control (PBS) preparados en el mismo día de su uso (“en fresco”) y en paralelo los días 2 y 5, respectivamente; iii) para la estimación del efecto del BSB en la estabilidad en el tiempo de los cócteles de anticuerpos se compararon las muestras con BSB y almacenadas durante 24 h y 4 días, con cóctel de anticuerpos “frescos” (PBS), respectivamente. Finalmente, iv) para la evaluación del efecto del reactivo BSB en la estabilidad de cóctel de anticuerpos con cierta antigüedad comparamos los resultados obtenidos de los ensayos con cócteles almacenados durante 24 h y 4 días, diluidos en PBS y BSB, correspondientes al día 2 y día 5, respectivamente.

Tabla 2. Comparación de los valores de Stain Index (SI) para cada condición experimental. En la tabla se muestran numeradas los cuatro tipos de comparaciones que se realizaron en el estudio, seguido del día de análisis de la muestra (DÍA 1, 2, 5) y las muestras a comparar: reactivo usado (PBS, BSB); día de preparación del cóctel de anticuerpos (día 1, 2, 5); voluntario del que procede la muestra de SP (A, B, C). BSB: Brilliant Stain Buffer (BD).

Comparaciones: condición basal vs. condición experimental

- i) **DÍA 1:** PBS cóctel día 1 (“en fresco”) vs. BSB cóctel día 1 (“en fresco”) (**voluntario A**)
 - ii) **DÍA 2:** PBS cóctel día 2 (“en fresco”) vs. PBS cóctel día 1 (24 h de preparado) (**voluntario B**)
DÍA 5: PBS cóctel día 5 (“en fresco”) vs. PBS cóctel día 1 (4 días de preparado) (**voluntario C**)
 - iii) **DÍA 2:** PBS cóctel día 2 (“en fresco”) vs. BSB cóctel día 1 (24 h de preparado) (**voluntario B**)
DÍA 5: PBS cóctel día 5 (“en fresco”) vs. BSB cóctel día 1 (4 días de preparado) (**voluntario C**)
 - iv) **DÍA 2:** PBS cóctel día 1 (24 h de preparado) vs. BSB cóctel día 1 (24 h de preparado) (**voluntario B**)
DÍA 5: PBS cóctel día 1 (4 días de preparado) vs. BSB cóctel día 1 (4 días de preparado) (**voluntario C**)
-

Una vez obtenidos los valores de SI, se calcula el ratio de SI para cada una de las comparaciones que se muestran en la [Tabla 2](#) según: “SI de la condición experimental (SI_e) / SI de la condición basal (SI_b)”, y considerando valores de SI significativamente diferente aquellos en los que el ratio SI (SI_e/SI_b) es menor que 0,6 o mayor que 1,5; considerando, por tanto, iguales aquellas ratios $0,6 < SI (SI_e/SI_b) < 1,5$. Estos límites se han determinado mediante el análisis de las imágenes de los tubos obtenidas por CMF y los SI de los fluorocromos asociadas a ellas, de tal forma que se determinó que cuando la ratio SI (SI_e/SI_b) era menor de 0,6 o mayor de 1,5 la diferencia entre la imagen en condición basal y la imagen en condición experimental era lo suficientemente significativa como para afirmar que las imágenes son diferentes en ambos tubos.

En el análisis de los resultados, no se calcularán los valores de SI para CD45 ni para cyCD154 puesto que para CD45 no tenemos en nuestra muestra ninguna población control negativa al expresar todas las poblaciones leucocitarias este antígeno y porque para cyCD154 la población control positiva son linfocitos T activados, los cuales no están presentes en nuestra muestra tampoco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis del efecto de BSB en la estabilidad de la combinación de anticuerpos preparados en el mismo día de su utilización

En relación con los efectos de añadir BSB a la mezcla de anticuerpos preparados en el momento (“en fresco”; [Tabla 2, i](#)), se encontraron diferencias en los valores de SI únicamente para 2/23 anticuerpos estudiados de la combinación de los paneles TCD4 y TCD8 (señalados en negrita (día 1) en la [Tabla 3](#)). En este sentido, el anticuerpo CD127-BV711 presentaba un mayor SI (ratio $SI_e/SI_b = 1,6$) mientras que el valor de SI para CD4-APCH7 en combinación con BSB disminuyó 0,4 veces respecto a la condición basal sin BSB ([Tabla 5, i](#)); sin embargo estos resultados no se alejan excesivamente de los valores basales (ratios SI_e/SI_b cercanos a 0,6 y 1,5), lo que nos sugiere que no existe en general un beneficio significativo en la resolución e identificación de las poblaciones leucocitarias mediante CMF con estos paneles de marcadores cuando se añade BSB a la mezcla de anticuerpos preparados y utilizados en el mismo día. Por el contrario, no se encontraron diferencias mayores a lo establecido para el resto de los anticuerpos incluidos en el panel TCD8 ([Tabla 4 y 6, i](#)).

Estos resultados concuerdan con lo esperado por la casa comercial del reactivo BSB (BD) para su uso en cócteles con 2 o más fluorocromos *Brilliant Violet*, puesto que CD127 está conjugado con uno de estos fluorocromos. Según BD, el BSB es compatible con otros marcadores conjugados con fluorocromos tradicionales, como fluoresceína, ficoeritrina o Alexa Fluor®; sin embargo no hacen mención a ningún efecto indeseado en fluorocromos de la familia de las aloficocianinas (APC) como la disminución del SI encontrado en el marcador CD4-APCH7¹⁹. Por este motivo, se debería hacer varias réplicas más de este ensayo para confirmar el efecto negativo del BSB en el marcador CD4-APCH7.

Tabla 3. Valores calculados de *Stain Index* (SI) para los distintos anticuerpos conjugados con fluorocromos incluidos en el panel TCD4 diseñado y estandarizado para la monitorización inmune en muestras de sangre periférica.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población control negativa	Población control positiva	Valores de <i>Stain Index</i> para las condiciones:								
				DÍA 1		DÍA 2			DÍA 5			
				PBS	BSB	PBS	PBS*	BSB*	PBS	PBS*	BSB*	
CD3	BV786	LB	LT	12,1	13,9	19,6	38,4	20,2	23,6	23,5	19,6	
CD4	APCH7	LB	LT CD4+	10,1	4,2	10,2	9,2	10,0	9,6	9,5	9,0	
CD25	VioBright FITC	Monocitos	LT CD4+ reguladores	11,1	11,3	11,5	13,5	13,6	8,8	10,7	12,0	
CD27	BV421	Basófilos	LT CD4+ naïve	44,7	53,7	64,1	108,9	79,2	65,3	63,2	58,2	
CD45RA	BV510	Basófilos	LT CD4+ naïve	72,2	60,9	57,7	93,4	62,8	61,1	63,6	50,1	
CD62L	BV650	LT CD4+ TH1/TH17 de memoria transicional	Basófilos	36,1	23,0	24,1	27,8	26,4	31,2	27,4	28,0	
CD127	BV711	NK	LT CD4+ naïve	2,4	3,7	2,8	3,1	2,4	2,1	2,0	1,7	
CD183 (CXCR3)	PE	Monocitos	LT CD4+ TH1 de memoria central	33,6	27,1	47,0	47,9	38,6	35,8	35,6	34,9	
CD185 (CXCR5)	APC	Monocitos	LB	9,3	8,8	12,3	12,2	12,5	15,3	15,1	14,9	
CD194 (CCR4)	PECy7	LT CD4+ naïve	LT CD4+ TH2	17,3	14,2	12,7	12,4	11,1	14,8	15,0	14,3	
CCR10	PerCPCy5.5	LT CD4+ naïve	LT CD4+ TH22	5,1	4,8	5,3	5,4	5,9	6,5	6,9	7,0	
CD196 (CCR6)	PECF594	LT CD4+ naïve	LB	62,2	58,2	49,4	49,5	53,5	48,4	48,1	43,9	

*Combinación de anticuerpos preparados en el día 1. Se resaltan en **negrita** los anticuerpos para los cuales se observaron diferencias.

LB: linfocitos B; LT: linfocitos T; NK: Célula *Natural Killer*; *bright*: brillante; *dim*: débil; +: positividad para la expresión del antígeno; -: negatividad para la expresión del antígeno; TH: Linfocito T *Helper*.

Tabla 4. Valores calculados de *Stain Index* (SI) para los distintos anticuerpos conjugados con fluorocromos incluidos en el panel TCD8 diseñado y estandarizado para la monitorización inmune en muestras de sangre periférica.

Anticuerpo	Fluorocromo	Población control negativa	Población control positiva	Valores de <i>Stain Index</i> para las condiciones:								
				DÍA 1		DÍA 2			DÍA 5			
				PBS	BSB	PBS	PBS*	BSB*	PBS	PBS*	BSB*	
CD3	BV786	LB	LT	18,2	15,4	24,4	28,4	22,7	11,8	25,2	18,8	
CD27	BV421	Basófilos	LT CD8+ de memoria central	60,1	60,9	91,2	93,7	84,5	47,1	43,1	49,8	
CD45RA	BV510	Basófilos	LT CD8+ naïve	143,9	142,9	167,1	164,5	156,3	101,2	156,0	129,7	
CD62L	BV650	LT CD8+ de memoria transicional	Basófilos	25,5	21,8	19,3	12,9	15,2	14,1	11,6	11,1	
CD8	PE CF594	LB	LT CD8+	78,9	48,6	64,0	60,5	132,9	47,1	57,3	68,6	
CD16	BV711	Basófilos	Neutrófilos	34,2	23,2	73,5	181,3	80,5	33,1	91,1	93,1	
CD28	PerCPCy5.5	NK	LT CD8+ de memoria central	1,8	1,6	0,7	1,5	1,8	2,0	2,9	2,5	
CD56	APC-Vio770	LB	NK CD56dim	2,4	2,7	3,8	3,7	3,5	2,3	2,3	2,4	
CD57	FITC	LB	NK CD56dim CD57+	10,2	9,3	19,2	14,1	10,1	9,3	8,1	9,3	
TCRγδ	PECy7	LT CD8-	LT TCRγδ+	9,2	8,4	9,8	9,9	6,7	4,4	9,1	6,9	
Granzima B	PE	LT CD8-	NK CD56dim Granz+ CD57-	24,5	32,0	34,9	27,4	33,1	11,0	15,5	14,0	

*Combinación de anticuerpos preparados en el día 1. Se resaltan en **negrita** los anticuerpos para los cuales se observaron diferencias.

LB: linfocitos B; LT: linfocitos T; NK: Célula *Natural Killer*; *bright*: brillante; *dim*: débil; +: positividad para la expresión del antígeno; -: negatividad para la expresión del antígeno; TH: Linfocito T *Helper*.

5.2. Efecto de la antigüedad del cóctel de anticuerpos en la estabilidad de los anticuerpos conjugados con fluorocromos

Llama la atención que en su mayoría, los fluorocromos que son excitados con el láser violeta (≈ 405 nm), CD3-BV786, CD27-BV421 y CD45RA-BV510 del panel TCD4 (Tabla 3) y CD16-BV711 (Tabla 4, Figura 4.B) del panel TCD8, tras 24h y 4 días de almacenado en PBS, mostraron un incremento en el valor del SI de entre 1,6-2,0 y 2,5-2,8 veces mayor, respectivamente, respecto a la condición basal (cóctel de anticuerpos “fresco”) (Tabla 5 y 6, ii). Este fenómeno también se vio en alguno de los anticuerpos marcados con CD28-PerCPCy5.5 y TCR $\gamma\delta$ -PECy7 con una ratio de 2,1 en ambos casos (Tabla 6), por lo que no está claro que exista necesariamente una asociación entre el canal de excitación del fluorocromo y el incremento del valor SI con la antigüedad del cóctel. Además, en el resto de fluorocromos del panel TCD4, el SI se mantuvo en dicho cóctel de > 24 h y PBS, lo que supone que fluorocromos como aquellos excitados por láseres de altas longitudes de onda (ej. FITC, PE, PerCP, APC) (Tabla 5, ii) mantengan su SI (ratio por debajo de 1,5 y encima de 0,6 (Figura 4)) con el paso del tiempo hasta un mínimo de 4 días. Este efecto puede deberse a que los fluorocromos de la familia *Brilliant Violet* tienen un brillo alto y una sensibilidad extremadamente alta en comparación con otros marcadores fluorescentes, lo que podría explicar estas variaciones del SI en estos fluorocromos²⁵.

Estos resultados no están dentro de lo esperado, es decir, que en lugar de empeorar la resolución de los picos de emisión de fluorescencia y el SI, lo que ocurre es no solo se mantiene el SI en todos los fluorocromos, sino que aumenta considerablemente en algunos de ellos. Esto posiblemente se deba a la formación de artefactos con el tiempo e interacciones entre los fluorocromos^{18,26}; sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que se deba a cambios en la capacidad de emisión de fluorescencia en el fluorocromo en si (ej. “fotobleaching” (*photobleaching*))²⁷.

Tabla 5. Ratios calculadas de *Stain Index* (SI) para los distintos anticuerpos conjugados con fluorescencia incluidos en el panel TCD4 diseñado y estandarizado para la monitorización inmune en muestras de sangre periférica.

		Ratios de <i>Stain Index</i> para las comparativas:						
Anticuerpo	Fluorocromo	i) BSB/PBS	ii) PBS*/PBS		iii) BSB*/PBS		iv) BSB*/PBS*	
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 5	DÍA 2	DÍA 5	DÍA 2	DÍA 5
CD3	BV786	1,1	2,0	1,0	1,0	0,8	0,5	0,8
CD4	APCH7	0,4	0,9	1,0	1,0	0,9	1,1	0,9
CD25	VioBright FITC	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,0	1,1
CD27	BV421	1,2	1,7	1,0	1,2	0,9	0,7	0,9
CD45RA	BV510	0,8	1,6	1,0	1,1	0,8	0,7	0,8
CD62L	BV650	0,6	1,2	0,9	1,1	0,9	1,0	1,0
CD127	BV711	1,6	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8	0,8
CD183 (CXCR3)	PE	0,8	1,0	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0
CD185 (CXCR5)	APC	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CD194 (CCR4)	PECy7	0,8	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0
CCR10	PerCPCy5.5	0,9	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0
CD196 (CCR6)	PECF594	0,9	1,0	1,0	1,1	0,9	1,1	0,9

*Combinación de anticuerpos preparados el día 1.

En verde (■) se muestran aquellas ratios de SI que superen el punto de corte establecido para determinar si dos valores de SI son similares ($0,6 < \text{Ratio SI} < 1,5$) o diferentes ($0,6 > \text{Ratio SI} > 1,5$). Se resaltan en **negrita** los anticuerpos para los cuales se observaron diferencias.

Tabla 6. Ratios calculadas de *Stain Index* (SI) para los distintos anticuerpos conjugados con fluorescencia incluidos en el panel TCD8 diseñado y estandarizado para la monitorización inmune en muestras de sangre periférica.

		Ratios de <i>Stain Index</i> para las comparativas:						
Anticuerpo	Fluorocromo	i) BSB/PBS	ii) PBS*/PBS		iii) BSB*/PBS		iv) BSB*/PBS*	
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 5	DÍA 2	DÍA 5	DÍA 2	DÍA 5
CD3	BV786	0,8	1,2	2,1	0,9	1,6	0,8	0,7
CD27	BV421	1,0	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9	1,2
CD45RA	BV510	1,0	1,0	1,5	0,9	1,3	1,0	0,8
CD62L	BV650	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	1,2	1,0
CD8	PE CF594	0,6	0,9	1,2	2,1	1,5	2,2	1,2
CD16	BV711	0,7	2,5	2,8	1,1	2,8	0,4	1,0
CD28	PerCPCy5.5	0,9	2,1	1,5	2,6	1,3	1,2	0,9
CD56	APC-Vio770	1,1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0
CD57	FITC	0,9	0,7	0,9	0,5	1,0	0,7	1,1
TCR $\gamma\delta$	PECy7	0,9	1,0	2,1	0,7	1,6	0,7	0,8
Granzima B	PE	1,3	0,8	1,4	0,9	1,3	1,2	0,9

*Combinación de anticuerpos preparados el día 1.

En verde (■) se muestran aquellas ratios de SI que superen el punto de corte establecido para determinar si dos valores de SI son similares ($0,6 < \text{Ratio SI} < 1,5$) o diferentes ($0,6 > \text{Ratio SI} > 1,5$). Se resaltan en **negrita** los anticuerpos para los cuales se observaron diferencias.

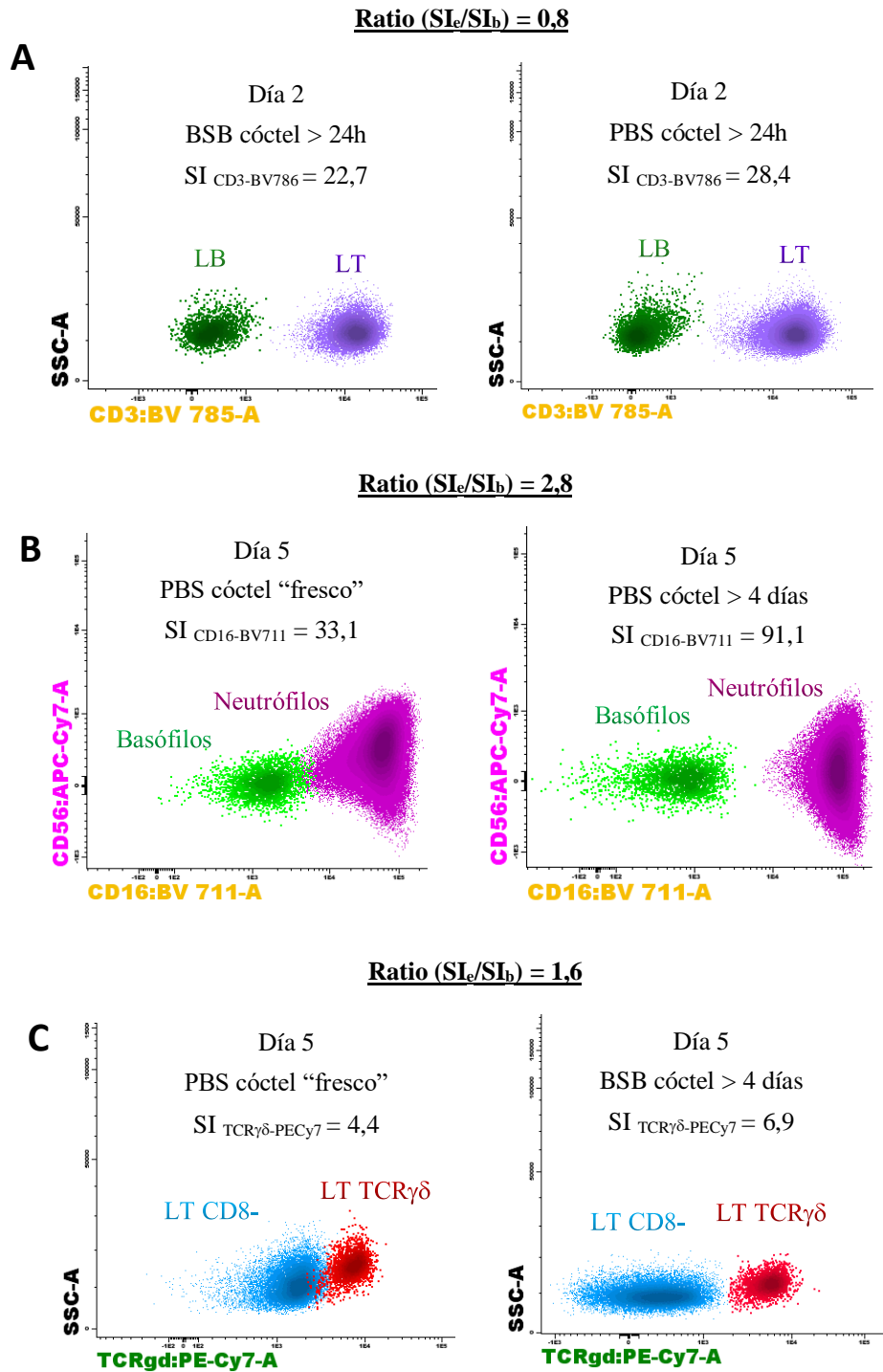


Figura 4. Imágenes ilustrativas de la capacidad de discriminación de distintas poblaciones leucocitarias de la sangre periférica durante el análisis por CMF para tres marcadores incluidos en el panel TCD8 (CD3, CD16 y TCRγδ) y los valores de *Stain Index* (SI) asociados en cada una de las condiciones. En el panel A no se observa una diferencia en los valores de SI que consideramos significativa ($0,6 > \text{Ratio de SI} > 1,5$) para el anticuerpo CD3-BV785 por lo que consideramos que este marcados tiene la misma expresión en ambos tubos por tener un ratio entre 0,6 y 1,5 (A), mientras que para los anticuerpos CD16-BV711 y TCRγδ-PECy7 (B y C) la expresión es diferente en los tubos comparados por tener un ratio mayor que 1,5. LB: Linfocito B; LT: Linfocito T. SI_b: valor de SI en la condición basal de la comparativa; SI_e: valor de SI en la condición experimental de la comparativa.

5.3. Efecto del reactivo BSB en la estabilidad de los anticuerpos marcados con fluorocromos tras el paso del tiempo

Al determinar si el reactivo BSB compensa el posible deterioro por el tiempo de la mezcla de anticuerpos, en el análisis de las ratios de BSB* (cóctel de < 24h o 4 días de antigüedad) contra PBS (cóctel “fresco”) se encontró que, para el panel TCD4, únicamente cambiaba el valor de SI para un anticuerpo (CD3-BV786), decreciendo el valor a la mitad cuando comparamos con el obtenido con un cóctel montado en el mismo día sin BSB (Tabla 5, iv). Ya que los fluorocromos *Brilliant Violet* tienen una alta sensibilidad²⁵ que puede afectar en la variabilidad del SI sería conveniente realizar mínimo 2 réplicas más del experimento para confirmar este efecto en CD3-BV786. Sin embargo, el resto de los anticuerpos de esta combinación mostraban valores similares de SI respecto a la condición basal, hallazgo que sugiere que el reactivo BSB no incrementa la resolución ni la separación de los picos de fluorescencia cuando se utiliza en combinación con una mezcla de anticuerpos del panel TCD4 antigua (Tabla 5, iii y iv).

En cambio, para la combinación de anticuerpos del tubos TCD8 aparecieron tres casos distintos de fluorocromos con un mayor SI que la muestra con PBS y cóctel de anticuerpos “fresco”: en el primer caso, los fluorocromos mostraban un mayor SI solamente en el tubo con cóctel de > 24 h de antigüedad y reactivo BSB (día 2), este es el caso de CD28-PerCPCy5.5 (valores de SI 2,6 veces mayores) (Tabla 6, iii); en el segundo caso, los fluorocromos mostraban un mayor SI solamente en el tubo con cóctel de > 4 días de antigüedad y reactivo BSB (día 5), este es el caso de CD16-BV711 y CD3-BV786 (2,8 y 1,6 veces más SI); y, en el último, los fluorocromos mostraban un mayor SI en ambos días, con cóctel de > 24 h de antigüedad (día 2) y con cóctel de > 4 días de antigüedad (día 5) y reactivo BSB, en ambas, cuyo ejemplo es CD8-PECF594 (2,1 (día 2) y 1,5 (día 5)).

Sorprendentemente, existe un único caso de un fluorocromo que en el tubo con PBS y cóctel “fresco” mostraba mayor SI que en el tubo con BSB y cóctel antiguo (<24 h) (BSB*), que es CD57-FITC, y tiene hasta 2 veces más SI que en el tubo con BSB*; sin embargo, este efecto no se repetía en el cóctel de 4 días de antigüedad, sugiriendo que el reactivo BSB disminuye la resolución de los picos de fluorescencia en un cóctel de antigüedad > 24h pero no en un cóctel de 4 días de antigüedad, lo que resulta algo contradictorio (Tabla 6, iii y iv). Por este motivo, es necesario realizar al menos 2 réplicas más del experimento para comprobar esta afirmación.

Las diferencias de SI a lo largo del tiempo pueden deberse a un posible efecto del reactivo BSB por el cual estabilice los cócteles de anticuerpos realizados con al menos >24h de antelación evitando la aparición de artefactos indeseados, y/o que la variabilidad en los valores de SI se deba a

las posibles interacciones entre los fluorocromos a lo largo del tiempo^{3,6,28,29}. En este sentido, se observa que los valores de SI obtenidos mediante el uso de mezclas de anticuerpos “envejecidas” con y sin el reactivo BSB (Tabla 2, iv) tenían las ratios de comparación por debajo del límite de significatividad (menores que 1,5), lo que significa que el SI no varía prácticamente al añadir el reactivo BSB a la muestra con cóctel de anticuerpos antiguo ($n_i > 24h$, $n_i > 4$ días) y, por tanto, no aumenta ni disminuye el SI de ningún anticuerpo del panel TCD4 (Tabla 5).

No obstante, existen dos fluorocromos en el panel TCD8 (Tabla 6, iv) que mostraban un valor de SI distinto: el fluorocromo CD8-PE CF594 tenía un SI 2,2 veces mayor en BSB y cóctel antiguo ($>24h$) que con ese mismo cóctel sin BSB; mientras para CD16-BV711 sucedía lo contrario, pues el valor de SI con BSB era 0,4 veces el de la muestra con PBS y cóctel antiguo ($>24h$). De este modo, para CD8-PE CF594 el reactivo BSB incrementó el SI en el cóctel antiguo ($>24h$), lo cual no ocurrió en su ausencia (PBS). Sin embargo, en el caso de CD16-BV711 sucedía lo contrario, pues el valor de SI del tubo con el cóctel “fresco” y PBS era igual al del cóctel antiguo ($>24h$) y BSB (ratio PBS^*/PBS 1,1, Tabla 6, iii). Esto sugiere que con el reactivo BSB el SI de CD16-BV711 (panel TCD8) disminuye cuando se utiliza un cóctel de $>24h$ de antigüedad. Sin embargo, la gran variabilidad en los resultados de este marcador requeriría de realizar 3 réplicas de este experimento, puesto que, los datos de CD16-BV711 del día 5 (y también los de otros fluorocromos) sugieren que la antigüedad del cóctel de anticuerpos no afecta negativamente a la resolución de los picos de fluorescencia, lo cual se debe corroborar. No obstante, en caso de que exista realmente esa variabilidad de CD16-BV711 en los cócteles “envejecidos”, una alternativa podría ser preparar el cóctel TCD8 a usar durante la semana y agregar CD16 en el momento de añadirle la muestra.

De este modo, el único incremento de SI (2,2) encontrado debido, aparentemente, a la presencia de BSB en cóctel antiguo es el ocurrido con el cóctel de $>24h$ de antigüedad (día 2) en el fluorocromo CD8-PE CF594 (Tabla 6, iv). Este incremento no se observó en el tubo con el cóctel de $>24h$, lo que sugiere que este incremento de SI se debe al reactivo BSB; no obstante, para corroborar esta afirmación es recomendable hacer varias réplicas del experimento para ver si este incremento de SI sigue apareciendo.

Por otro lado, el resto de fluorocromos del panel TCD8 (ej.: PE, PECy7, FITC, APC) tenían el mismo SI en las muestras de cóctel antiguo ($>24h$ o 4 días) con BSB y sin BSB (con SI iguales o cercanos al 1,0) (Tabla 6, iv) confirmando que dicho reactivo no tiene ningún efecto en el SI de estos fluorocromos en cócteles antiguos; aunque en algunos fluorocromos en cuyo tubo de PBS con cóctel antiguo ($>24h$ o >4 días) haya un incremento en el SI.

6. CONCLUSIONES

1. El uso del reactivo BSB añadido a las combinaciones de los paneles de anticuerpos TCD4 y TCD8 no aporta una ventaja adicional a la hora del análisis de las poblaciones leucocitarias en SP cuando las mezclas de anticuerpos son preparadas en las condiciones experimentales de uso habitual (cócteles preparados en el mismo día de su uso).
2. Es posible utilizar mezclas de anticuerpos (TCD4 y TCD8) preparados con hasta 4 días de antelación – almacenados a 4°C y en oscuridad – ya que el tiempo de “envejecimiento” del cóctel no parece afectar negativamente a la estabilidad de la mayoría de los fluorocromos en estas combinaciones de anticuerpos. En términos generales, el tiempo de almacenamiento de los cócteles de anticuerpos afecta en menor medida a la estabilidad del panel TCD4 que a la de TCD8. Además, no existen grandes diferencias entre los cócteles preparados desde 24h y 4 días, lo que supone que la estabilidad de los cócteles “envejecidos” es la misma durante la semana para la que se prepara el cóctel.

De este modo, la mezcla de anticuerpos del tubo TCD4 se podría preparar con antelación, bien con BSB o con PBS, aunque no sería necesario usar BSB, pudiéndose usar el cóctel hasta 4 días después de haberse preparado. Por otro lado, el tubo TCD8 también podría realizarse con anticipación; sin embargo, sería necesario confirmar los resultados obtenidos, ya que no es esperable que con el tiempo el SI sea mayor, aunque sí que se pueda mantener. En caso de confirmarse los resultados para el tubo TCD8, no existiría algún beneficio adicional al incluir BSB en ninguno de los cócteles.

3. Existe cierta variabilidad en los valores obtenidos del parámetro SI para algunos anticuerpos del panel TCD8 (especialmente para CD16-BV711) y que parece estar asociada con el tiempo de “envejecimiento” de la mezcla de anticuerpos, pero no con el uso del reactivo BSB; estos resultados necesitan confirmarse en nuevos experimentos.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Laura todo el esfuerzo, tiempo y dedicación que me ha dado durante estos últimos años de carrera y de lo que siempre estaré agradecido. También quiero dar las gracias por todos los momentos juntos, todas las risas y recuerdos de laboratorio, junto a María y Fernando que nunca olvidaré. Pero sobre todo quiero agradecer haberme hecho crecer como científico y como persona, como adolescente y como adulto, a mostrarme la tenacidad con la que trabajas y la cercanía con la que te comunicas, en definitiva, gracias por no haberme ahorcado antes de tiempo:)

También quería agradecer a Julia por acogerme en vuestra gran familia dos años atrás y haberme permitido colaborar con grandes profesionales en la materia y mejores personas. Del mismo modo, quiero dar las gracias a María González, por ser un ejemplo de científica, mujer y madre digna de admirar, y a Fernando porque sin ti las tardes en FISH no serían lo mismo.

Por supuesto, no hubiese llegado hasta aquí sin los que me rodean día a día en las clases, en la calle y en la distancia, por eso quiero dar las gracias por estar siempre ahí a los mejores vecinos que tengo que son Ana S., Jorge U. y Pablo R., junto a las Saras, Mónica, Marcos, Lucía, Paula, María, Andrea N., Eva, Ana T. que siempre están en los mejores y peores momentos, así como a todos mis compañeros del Grado en Biotecnología de la USAL.

Of course, I couldn't forget the craziest family I've ever had, which is my dear friends from my ERASMUS in Ghent, Belgium: María, Rete, Dario, Florian, Anissa, Lisa, Victor, Alice, Queniee, Dani, Jauma, Xia, Claudio, Ulaş, Teodora, Emily, Elias, Simona, Emilio, Paca, Martina, Andrea, Noemi, Emre, Daria, Anna, Vick, Sophie, Bobby and the future family members I will meet. Without your company, Corona times would have been much worse. Thank you all!!

Y por último y más importante, quiero darle las gracias a los que me trajeron al mundo y a los que me aguantan cada día. A mi madre Lourdes, por ser un ejemplo de valentía, supervivencia y fuerza de voluntad; a mi padre José Alberto, por ser una persona honesta, paciente y protectora; y a mi hermano Darío, por ser un ejemplo de superación, motivación y sentido del humor. Sabéis que sin vosotros sí que no podría haber llegado hasta aquí, y me gustaría contar siempre con vosotros en el futuro. Así que por lo que habéis hecho, por lo que hacéis y por lo que haréis os doy las gracias. Os quiero.

¡¡Gracias a todos!!

8. REFERENCIAS

1. Macey MG. Flow cytometry: Principles and applications. *Flow Cytom Princ Appl.* 2007;2(2):1-290. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3>
2. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
3. Flores-Montero J, Kalina T, Corral-Mateos A, et al. Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2019;475(June):112618. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.06.009>
4. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods.* 2000;243(1-2):77-97. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5)
5. Wilkerson MJ. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2012;42(1):53-71. <https://doi.org/10.1016/j.cvs.2011.09.012>
6. Rahman M. Introduction to Flow Cytometry; AbD Serotec; abdserotec.com.
7. Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood.* 2009;114(1):33-37. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-197368>
8. Campana D, Coustan-Smith E. *Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry* Key Terms: Minimal Residual Disease; Flow Cytometry; Acute Lymphoblastic Leukemia; Acute Myeloid Leukemia *BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE LEUKEMIA.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19990815\)38:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19990815)38:4)
9. Dr Dimitri Diavatopoulos. PERISCOPE (EuroFlow) - University of Salamanca (USAL). <https://periscope-project.eu/consortium/usal/>
10. Diavatopoulos DA, Mills KHG, Kester KE, et al. PERISCOPE: road towards effective control of pertussis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(5):e179-e186. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30646-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30646-7)
11. Barrena S, Almeida J, Del Carmen García-Macias M, et al. Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: Utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Histopathology.* 2011;58(6):906-918. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03804.x>
12. Botafogo V, Pérez-Andres M, Jara-Acevedo M, et al. Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4+ T Cells in Human Blood Using a Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol.* 2020;11(February):1-16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00166>
13. Diavatopoulos DA. PERISCOPE: road towards effective control of pertussis. *Lancet Infectious Dis.* 2019;19:179-186. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30646-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30646-7)
14. Escribano L, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):514-521. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.003>

15. Hauswirth AW, Almeida J, Nieto WG, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) with normal lymphocyte counts is associated with decreased numbers of normal circulating B-cell subsets. *Am J Hematol.* 2012;87(7):721-724. <https://doi.org/10.1002/ajh.23214>
16. Moratto D, Chiarini M, Giustini V, et al. Flow Cytometry Identifies Risk Factors and Dynamic Changes in Patients with COVID-19. *J Clin Immunol.* 2020;40(7):970-973. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00806-6>
17. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2010;78(4):239-252. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20512>
18. Mike Leach, Mark Drummond AD. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis.* (Wiley-Blackwell, ed.); 2013.
19. BD Biosciences - Europe. Brilliant Stain Buffer. Accessed May 17, 2021. <https://www.bdbiosciences.com/eu/reagents/research/antibodies-buffers/immunology-reagents/immunology-buffers-and-ancillary-reagents/brilliant-stain-buffer/p/563794>
20. Euroflow Consortium. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining. *Stand EuroFlow Protoc.* 2018;Version 1.(August):1-8. <https://www.euroflow.org/protocols/>
21. For E, Flores J. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Bulk Lysis for MRD panels. *Stand EuroFlow Protoc.* 2018;Version 1.(June):1-8. <https://www.euroflow.org/protocols/>
22. Gonçalves VDB. Identificação de múltiplas populações de células T CD4+ funcionalmente relevantes através da citometria de fluxo de 14 cores: desenvolvimento, padronização e validação do método. Published online 2010:1-10.
23. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic multicolor flow cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2017;2017(April):5.4.1-5.4.38. <https://doi.org/10.1002/cpim.26>
24. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytom Part A.* 2004;62(2):169-173. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20092>
25. Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, et al. Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytom Part A.* 2012;81 A(6):456-466. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22043>
26. Donnenberg VS, Donnenberg AD. Coping with artifact in the analysis of flow cytometric data. *Methods.* 2015;82:3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.012>
27. van den Engh G, Farmer C. Photo-bleaching and photon saturation in flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(7):669-677. <https://doi.org/10.1002/cyto.990130702>
28. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8 II):1221-1229. <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1221>
29. Multicolor Staining Guide. Accessed June 21, 2021. <https://www.biolegend.com/en-us/multicolor-staining>

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I. Reactivos y soluciones

Los reactivos y soluciones empleados durante el procesamiento y adquisición de las muestras son los siguientes²⁰:

- Tampón Fosfato Salino (PBS) filtrado (1X) Na^+/K^+ : KCl 2.68 mM + KH_2PO_4 1.47 mM + NaCl 137 mM + Na_2HPO_4 7.98 mM.
- Albúmina de Suero Bovino (BSA); > 98% de pureza.
- Solución de lavado (PBS/BSA): PBS filtrado (1X) Na^+/K^+ + 0.09% NaN_3 + 0.2% BSA + 2 mM solución EDTA.