



INTRODUCCION A LA CITOMETRIA DE FLUJO

¿QUE ES LA CITOMETRIA DE FLUJO?

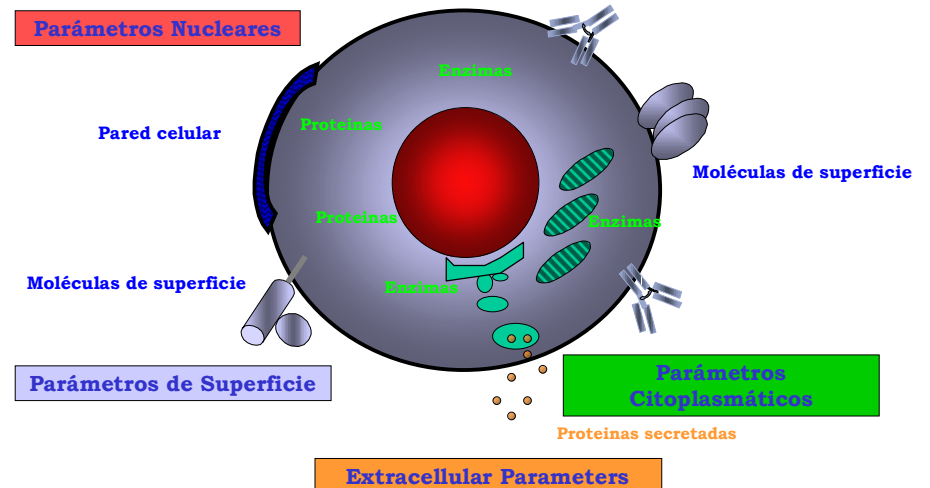
Método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz (“light scatter”) de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad (hasta miles de células/segundo) frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada



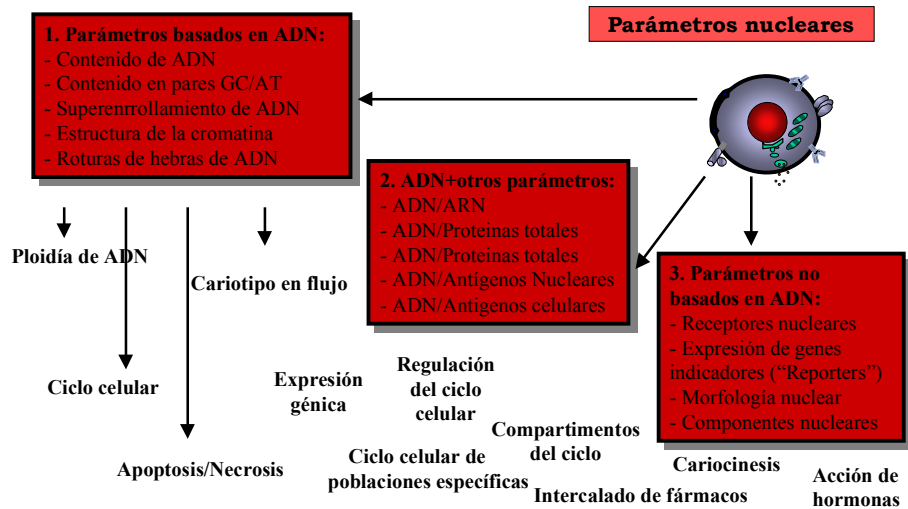
¿QUE SE PUEDE ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO?

- Proteínas extracelulares Nivel molecular
- Secuencias de ADN o ARN libres (con ayuda de esferas fluorescentes)
- Complejos inmunes circulantes
- Viriones individuales
- Liposomas Nivel subcelular
- Cromosomas aislados
- Orgánulos aislados
- Núcleos aislados
- Bacterias Nivel celular
- Hongos unicelulares
- Células humanas y animales
- Protoplastos vegetales
- Hibridomas y fusiones celulares Nivel supracelular
- Esferoides
- Organismos pluricelulares

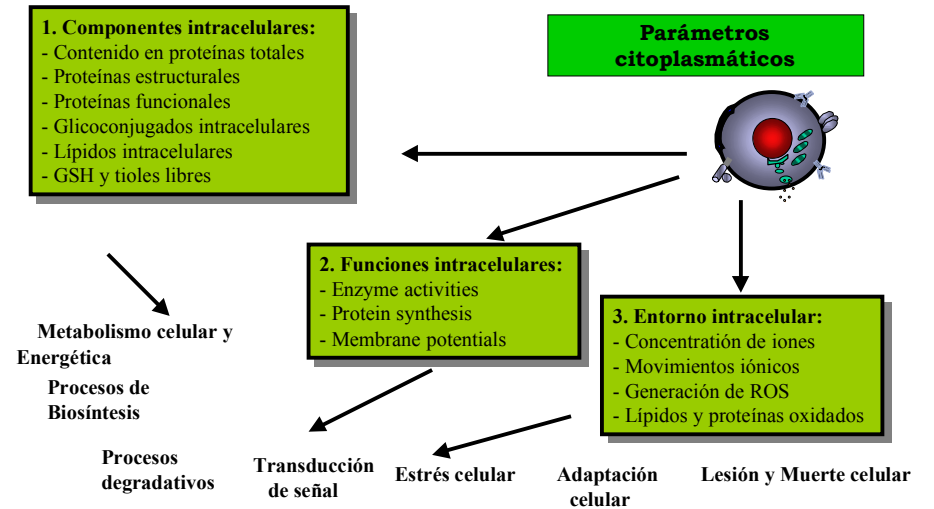
¿QUE PARAMETROS SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO?



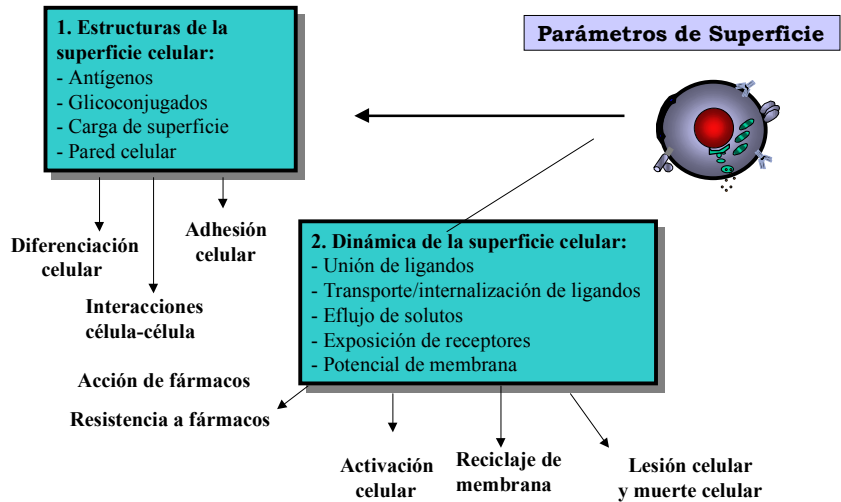
PARAMETROS NUCLEARES QUE SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO



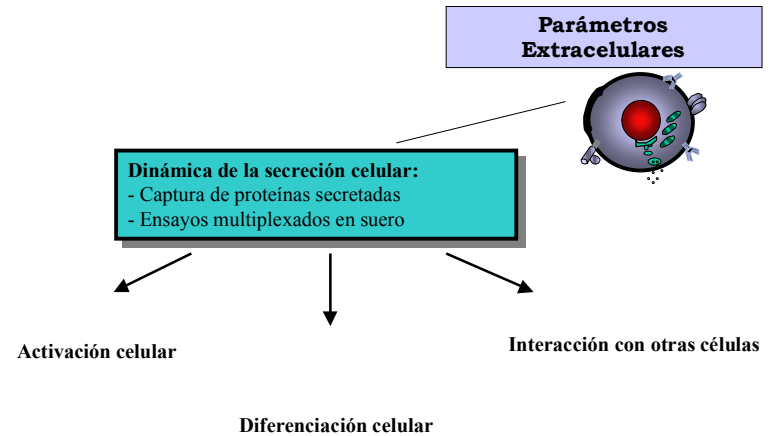
PARAMETROS CITOPLASMATICOS QUE SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO



PARAMETROS DE SUPERFICIE QUE SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO



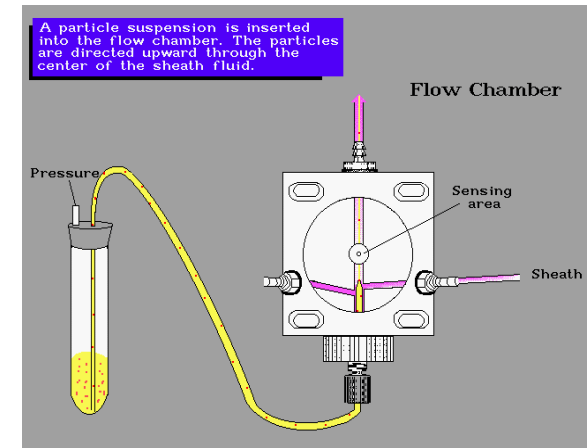
PARAMETROS EXTRACELULARES QUE SE PUEDEN ANALIZAR POR CITOMETRIA DE FLUJO



¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?

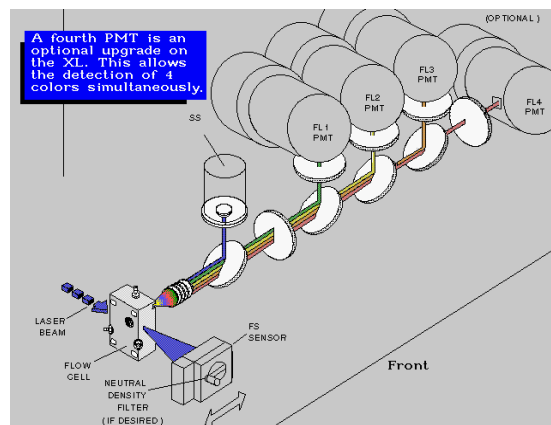


¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



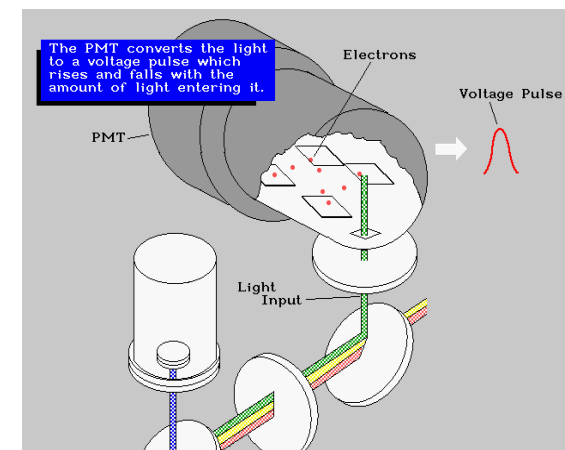
Inyección de la muestra y cámara de flujo

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



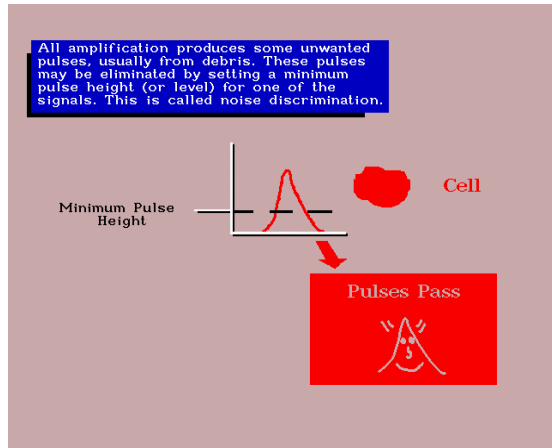
Emisión de fluorescencia y bancada óptica

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



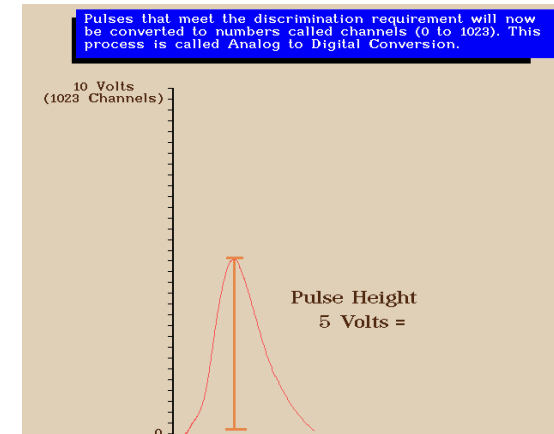
Amplificación de las señales de fluorescencia

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



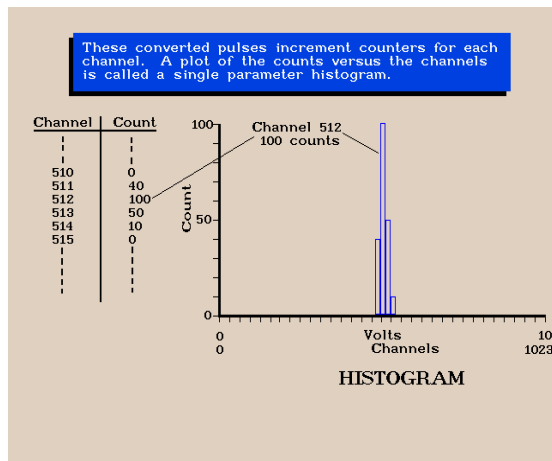
Eliminación de señales no deseadas: Discriminador

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



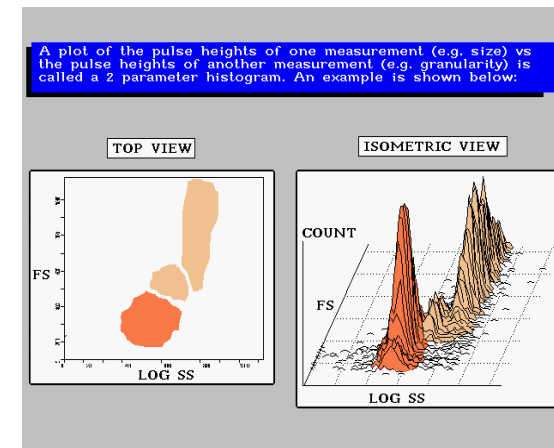
Cuantificación de las señales: Convertidor analógico-digital

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



Clasificación de las señales: Histograma de frecuencias

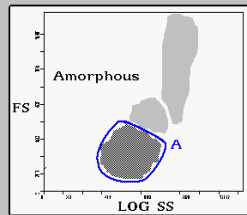
¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?



Presentación de datos: Dot-plots y proyecciones

¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?

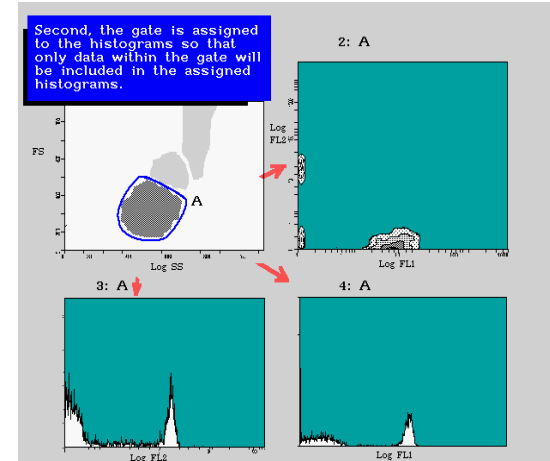
The operator can isolate a population and collect data based only on that population. The process is called gating. There are two steps. First, a gate is drawn. In the example below, the gate is an amorphous region.



Acotamiento de subpoblaciones de interés: “gating”

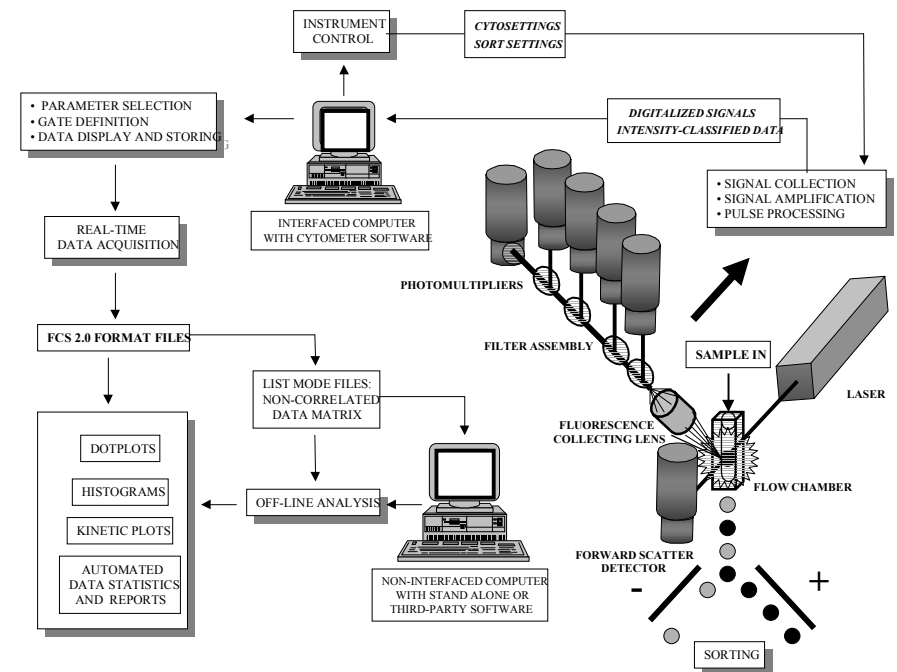
¿CÓMO FUNCIONA UN CITÓMETRO DE FLUJO?

Second, the gate is assigned to the histograms so that only data within the gate will be included in the assigned histograms.



Generación de resultados: Dot-plots múltiples

ESQUEMA DE UN SISTEMA DE CITOMETRIA



EJEMPLOS DE CITOMETROS DE FLUJO A LO LARGO DE LA HISTORIA



EPICS PROFILE



EPICS XL



FACSCan



FACSCalibur



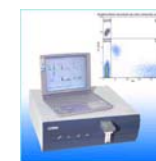
LSR



Cytoron



PAS

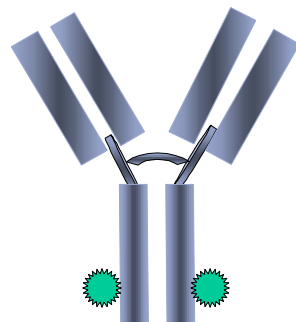
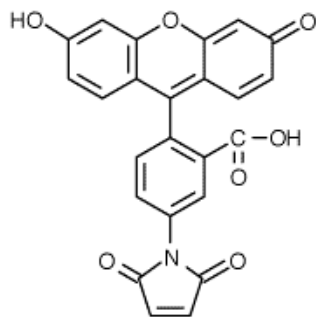


CyFlow



Bryte

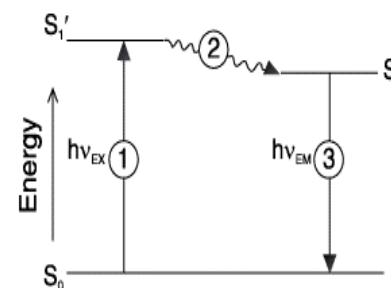
FLUOROCROMOS Y MARCADORES FLUORESCENTES



¿QUÉ ES FLUORESCENCIA?

1

Un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es absorbido por la molécula fluorescente, creando un estado excitado con un electrón en singlete (S_1').



2

El estado excitado tiene una duración de $1-10 \times 10^{-9}$ segundos

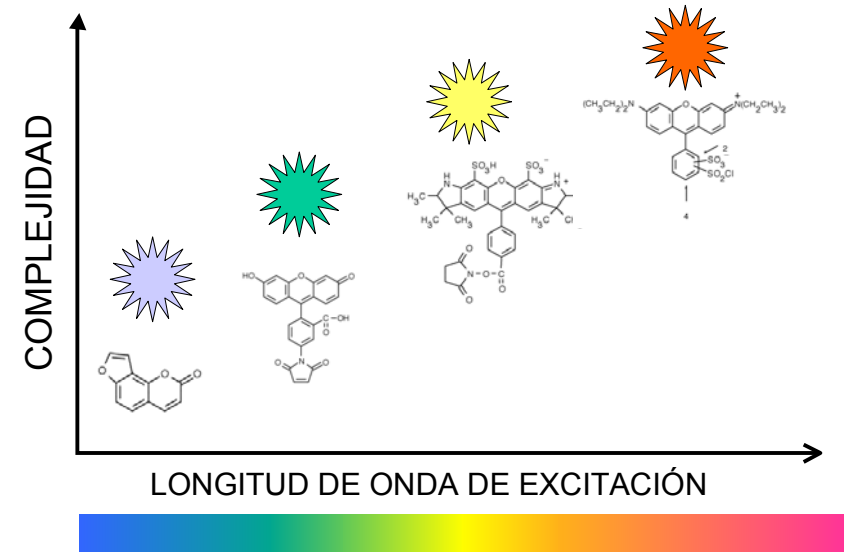
3

Un fotón de energía $h\nu_{EM}$ es emitido, para devolver la molécula fluorescente a su estado basal S_0 .

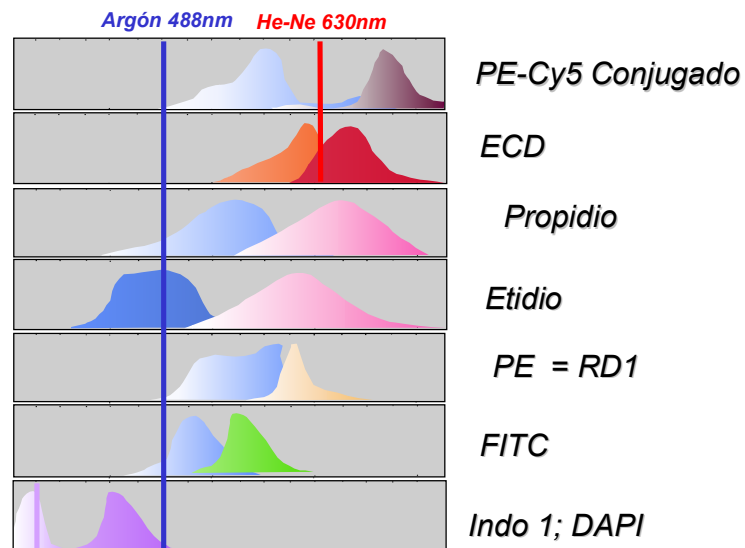
CONCEPTOS ESENCIALES EN FLUORESCENCIA

- **Fluorocromo:** Molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía (mayor longitud de onda).
- **Fluoróforo:** Parte del fluorocromo responsable de la emisión de fluorescencia.
- **Marcador fluorescente o sonda fluorescente:** Fluorocromo diseñado para unirse a una región específica de una muestra biológica o responder a un determinado estímulo.
- **Longitud de onda de excitación:** Longitud de onda a la que un fluorocromo puede absorber fotones.
- **Longitud de onda de emisión:** Longitud de onda a la que un fluorocromo emite fotones de fluorescencia.
- **Desplazamiento de Stokes:** Separación entre las longitudes de onda de absorción y de emisión en un fluorocromo.
- **Rendimiento cuántico:** cociente entre el número de fotones de fluorescencia emitidos y el número de fotones absorbidos

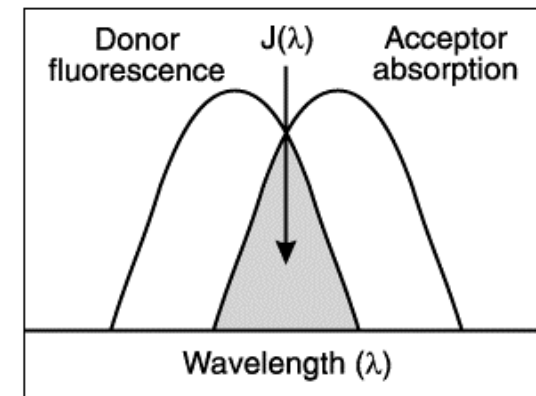
RELACION ESTRUCTURA/FLUORESCENCIA



EJEMPLOS DE ESPECTROS DE ABSORCION Y EMISION DE FLUOROCROMOS COMUNES



FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER



PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS MARCADORES FLUORESCENTES

- REACTIVIDAD CON GRUPOS QUÍMICOS
- UNIÓN NO COVALENTE A ESTRUCTURAS
- INTERACCIÓN CON IONES O RADICALES
- SUSCEPTIBILIDAD A REACCIONES ENZIMÁTICAS
- PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANA

CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS MARCADORES FLUORESCENTES

- MOLECULAS CON REACTIVIDAD QUÍMICA
- MOLECULAS CON ESPECIFICIDAD ESTRUCTURAL
- INDICADORES Y QUELANTES DE IONES
- SUSTRATOS DE ENZIMAS Y TRANSPORTADORES
- MACROMOLECULAS Y POLÍMEROS SINTÉTICOS
- FLUOROCROMOS INTRACELULARES NATURALES

MOLECULAS CON REACTIVIDAD QUÍMICA

- REACTIVOS DE GRUPOS TIOL (SH-)
- REACTIVOS DE GRUPOS AMINO (NH₂-)
- REACTIVOS DE BASES NITROGENADAS

MOLECULAS CON ESPECIFICIDAD ESTRUCTURAL

- ANTICUERPOS CONJUGADOS CON FLUOROCROMOS
- LECTINAS CONJUGADAS CON FLUOROCROMOS
- MARCADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS
- MARCADORES DE LÍPIDOS
- LIGANDOS FLUORESCENTES DE RECEPTORES

INDICADORES Y QUELANTES

- INDICADORES DE pH
- QUELANTES DE CATIONES
- SENSORES DE POTENCIAL DE MEMBRANA
- SENSORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

SUSTRATOS DE ENZIMAS Y TRANSPORTADORES

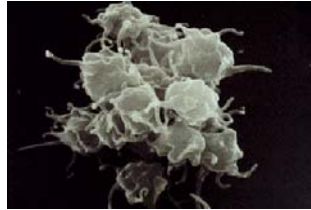
- SUSTRATOS DE ENZIMAS HIDROLITICOS
- SUSTRATOS DE ENZIMAS OXIDATIVOS
- SUSTRATOS DE ENZIMAS REDUCTIVOS
- SUSTRATOS DE ENZIMAS DE TRANSFERENCIA
- SUSTRATOS DE P-GLICOPROTEINA
- ANALOGOS FLUORESCENTES DE BIOMOLECULAS

MACROMOLECULAS Y POLIMEROS SINTETICOS

- PROTEINAS CONJUGADAS CON FLUORESCENCIA
- DEXTRANOS CONJUGADOS CON FLUORESCENCIA
- ESFERAS DE EMISION AMPLIA DE FLUORESCENCIA
- ESFERAS CON FLUORESCENCIA ESPECIFICA
- ESFERAS FLUORESCENTES CALIBRADAS
- ESFERAS RECUBIERTAS DE ANTICUERPO

FLUOROCROMOS INTRACELULARES NATURALES

- NUCLEOTIDOS DE NICOTINA REDUCIDOS (NADH, NADPH)
- NUCLEOTIDOS DE FLAVINA OXIDADOS (FMN; FAD)
- CLOROFILAS
- FICOBILIPROTEINAS
- PROTEINAS FLUORESCENTES (GFP)



APLICACIONES CLINICAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

APLICACIONES CLINICAS GENERALES

- DIAGNOSTICO BASADO EN EL ANALISIS CELULAR
- PRONOSTICO BASADO EN EL ANALISIS CELULAR
- EVALUACION Y MONITORIZACION DE TRATAMIENTO
- ANALISIS DE LA LESION Y MUERTE CELULAR

APLICACIONES DIAGNOSTICAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

- CARACTERIZACION DE LAS CELULAS NORMALES
- IDENTIFICACION Y DETECCION DE CELULAS ANORMALES

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE CELULAS NORMALES

- PARAMETROS ESTRUCTURALES:
 - Tamaño
 - Complejidad
- ANTIGENOS DE SUPERFICIE:
 - Identidad
 - Linaje
 - Función
 - Activación
- ADN, ARN Y PARAMETROS RELACIONADOS:
 - Ploidía
 - Estado proliferativo
 - Estadío de maduración
 - Expresión génica
- BIOQUIMICA INTRACELULAR:
 - Condiciones basales
 - Respuesta bioquímica a estímulos controlados

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE CELULAS ANORMALES

- ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA CELULAR:
 - Cambios en tamaño
 - Cambios en granularidad
- ALTERACIONES EN EL INMUNOFENOTIPO:
 - Inmunoproliferación/ Inmunodeficiencia
 - Inmunodisfunción
- ALTERACIONES EN EL GENOTIPO:
 - Cambios en el contenido de ADN (ploidía)
 - Cambios en la expresión de genes
- ALTERACIONES EN LA BIOQUIMICA INTRACELULAR:
 - Cambios en la síntesis y concentración de moléculas
 - Cambios en la actividad de enzimas y en el flujo a través de rutas
 - Alteraciones en el número y la función de orgánulos subcelulares
 - Cambios en la respuesta bioquímica a estímulos controlados
- DETECCION DE CELULAS INFRECIENTES (“CELULAS RARAS”)
 - Detección de células tumorales circulantes
 - Detección de células fetales en sangre materna
 - Detección de células activadas o antígeno-específicas circulantes

APLICACIONES PRONOSTICAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

- CORRELACION DE PARAMETROS CITOMETRICOS CON OTROS PARAMETROS CLINICOS BIEN ESTABLECIDO:
 - Estudios retrospectivos con material de archivo
 - Estudios prospectivos
- PARAMETROS IMPLICADOS DIRECTAMENTE EN EL PROCESO PATOLOGICO:
 - Análisis de muestras específicas de la patología
 - Análisis de parámetros específicos de la patología
- PARAMETROS IMPLICADOS INDIRECTAMENTE EN EL PROCESO PATOLOGICO :
 - Análisis de muestras indicadoras (“reporter”)
 - Análisis de parámetros indicadores de la patología (“pathology-reporter”)
 - Análisis de parámetros predictivos de riesgo

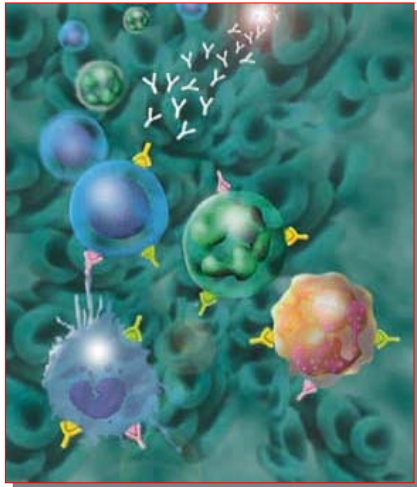
APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN LA TERAPEUTICA

- SELECCION DE CELULAS EN LA TERAPIA CELULAR:
 - Análisis de progenitores en el trasplante autólogo
 - Pruebas cruzadas (“cross-match”) en trasplantes heterólogos
 - Detección y cuantificación de leucocitos residuales en hemopreparados
- ANALISIS DE LA ACCION TERAPEUTICA A NIVEL CELULAR:
 - Cambios en parámetros estructurales
 - Cambios en parámetros funcionales
- ANALISIS DE LA ACCION TERAPEUTICA A NIVEL DEL PACIENTE :
 - Detección de recidivas y enfermedad mínima residual
 - Establecimiento de patrones pronósticos de éxito terapéutico
- DETECCION Y ANALISIS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA:
 - Análisis de la captación y retención de fármacos (fenotipo MDR)
 - Análisis del metabolismo de fármacos

APLICACION DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN EL ANALISIS DE LA LESION Y MUERTE CELULAR

- DETECCION DE LESION CELULAR SUBLETAL:
 - Cambios en parámetros estructurales
 - Changes in functional parameters
- CUANTIFICACION DE LA VIABILIDAD CELULAR:
 - Determinación de efectos citotóxicos globales
 - Control de calidad de las preparaciones celulares
- CARACTERIZACION DE LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR:
 - Identificación y análisis de células apoptóticas
 - Identificación de células necróticas

APLICACIONES DE LA CITOMETRIA EN INMUNO-HEMATOLOGIA



APLICACIONES DE LA CITOMETRIA EN INMUNO-HEMATOLOGIA

- ANALISIS DE ANTIGENOS:
 - Inmunofenotipo de superficie
 - Detección de antígenos intracelulares
 - Detección de antígenos circulantes
- ANALISIS DE ANTICUERPOS:
 - Detección de anticuerpos circulantes
 - Detección de anticuerpos unidos a células
- ANALISIS DE LA FUNCION CELULAR:
 - Análisis de la proliferación celular
 - Análisis de la bioquímica intracelular
 - Análisis de la muerte celular

INMUNOFENOTIPO DE SUPERFICIE

- Identificación de subpoblaciones celulares mediante anticuerpos monoclonales de especificidad conocida
- Sistema CD: Clasificación de grupos de anticuerpos (“Clusters of Differentiation”) que reconocen los mismos antígenos en los mismos tipos celulares
- Proporciona información sobre:
 - Linaje celular
 - Estadío de maduración hematopoyética
 - Implicación en la respuesta inmunitaria
 - Grado de activación celular

INMUNOFENOTIPO DE SUPERFICIE

- Identificación de subpoblaciones celulares en la hematopoyesis
 - Diagnóstico y clasificación de enfermedades hematológicas:
 - Leucemias agudas y crónicas
 - Linfomas
 - Inmunodeficiencias
 - Hemoglobinuria paroxística nocturna
 - Detección de enfermedad mínima residual
 - Enumeración de precursores hematopoyéticos CD34⁺
 - Diagnóstico de enfermedades congénitas plaquetarias:
 - Tromboastenia de Glanzmann
 - Síndrome de Bernard-Soulier

ANTIGENOS INTRACELULARES

- Detección de proteínas intracelulares con anticuerpos fluorescentes
- Requiere el ajuste de procedimientos metodológicos clave:
 - Suspensión de células individuales e intactas
 - Preservación de los epitopos a determinar
 - Fijación
 - Permeabilización
 - Marcaje con los anticuerpos
 - Análisis multiparamétrico

ANTIGENOS INTRACELULARES

- Detección de citokeratinas en muestras heterogéneas:
 - Identificación específica de las células tumorales
 - Detección de células metastáticas en nódulos linfáticos
 - Detección de células tumorales circulantes
- Fenotipo intracelular de leucemias y linfomas:
 - Cadenas ligeras de Ig intracelulares: κ y λ
 - Antígenos de superficie aún no expresados: CD3, CD22
 - Enzimas intracelulares: TdT, MPO
- Expresión de reguladores del ciclo celular: Ciclina D1
- Expresión de proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Rb
- Expresión de proteínas supresoras de tumores: p53
- Análisis de citocinas intracelulares: Fenotipo Th0, Th1 y Th2

ANTICUERPOS CIRCULANTES

- Detección de autoanticuerpos circulantes:
 - Anticuerpos antiplaquetarios
 - Anticuerpos antineutrófilos
- Detección de aloanticuerpos circulantes :
 - Pruebas cruzadas pre-transplante
 - Uso de esferas recubiertas con HLA específicos
- Detección de anticuerpos unidos a células de la sangre

ANALISIS DE LA INMUNOPROLIFERACION

- Análisis monoparamétrico del ciclo celular: Contenido de ADN
- Análisis multiparamétrico del ciclo celular:
 - Fenotipo de superficie y contenido de ADN
 - Contenido de ADN y antígenos relacionados con el ciclo
- Análisis de la historia de división celular:
 - Trazadores celulares ("Cell-tracking dyes":PKH-1, CFSE)
 - Trazadores celulares y fenotipo de superficie

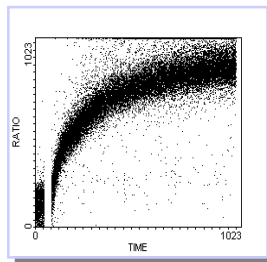
ANALISIS DE LA BIOQUIMICA INTRACELULAR

- Funciones bioquímicas de la inmunidad específica:
 - Síntesis y secreción de citokinas
 - Expresión de moléculas de adhesión
 - Movimientos iónicos tras la activación celular
- Funciones bioquímicas de la inmunidad innata:
 - Fagocitosis y destrucción de microorganismos
 - Generación intracelular de especies reactivas de oxígeno
 - Actividad proteolítica intracelular
 - Respuestas quimiotácticas:
 - Expresión de moléculas de adhesión
 - Explosión oxidativa ("Oxidative burst")
- Funciones bioquímicas de las plaquetas:
 - Activación y agregación plaquetarias

ANALISIS DE LA MUERTE CELULAR EN EL SISTEMA INMUNITARIO

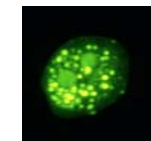
- Análisis de células efectoras citolíticas:
 - Identificación fenotípica de subpoblaciones CD8 y NK
- Análisis de la citotoxicidad mediada por células:
 - Análisis de la interacción entre células efectoras y dianas
- Análisis de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos:
 - Monitorización de la terapia con anticuerpos monoclonales
- Análisis del proceso y mecanismo de muerte celular:
 - Identificación y cuantificación de células apoptóticas
 - Identificación y cuantificación de células necróticas
 - Análisis de parámetros celulares durante la apoptosis

APLICACIONES GENERALES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN INVESTIGACION BASICA



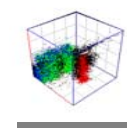
VENTAJAS DE LA CITOMETRIA EN APLICACIONES FUNCIONALES

Acceso no invasivo a parámetros celulares



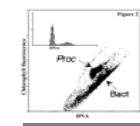
Múltiples procesos funcionales analizables

Análisis multiparamétrico



Integración de respuestas y mecanismos

Análisis de gran número de células

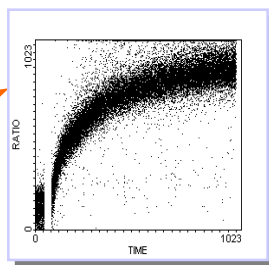


Resolución de heterogeneidad celular

Selección fenotípica de subpoblaciones

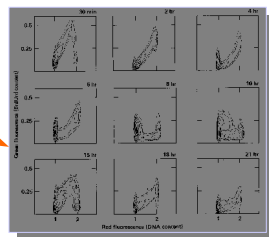
ENSAYOS CINETICOS POR CITOMETRIA DE FLUJO

Análisis Cinético in situ



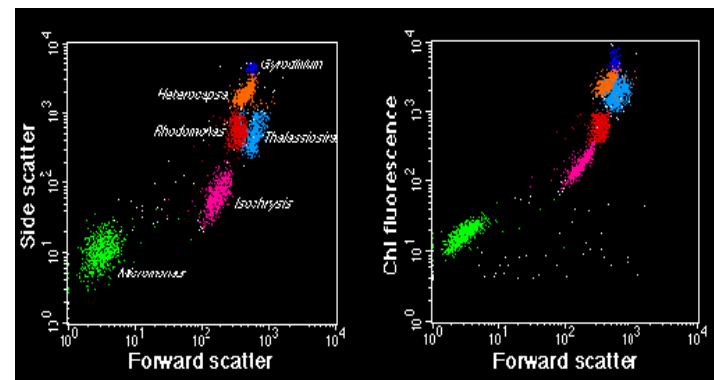
Detección de efectos tempranos o transitorios

Análisis secuencial



Evaluación de procesos dinámicos

APLICACIONES DE LA CITOMETRIA EN CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES



APLICACIONES DE LA CITOMETRIA EN CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES

- Análisis de poblaciones unicelulares en su entorno:
 - Identificación y taxonomía
 - Estimación de biomasa
 - Detección de contaminaciones
- Detección de toxicidad in situ:
 - Marcadores de exposición
 - Marcadores de efecto bioquímico
- Uso de microorganismos naturales o de laboratorio como indicadores de toxicidad
- Análisis genómico en células procedentes de organismos superiores

SISTEMAS ESPECIALES DE CITOMETRIA PARA EL ANALISIS MEDIOAMBIENTAL



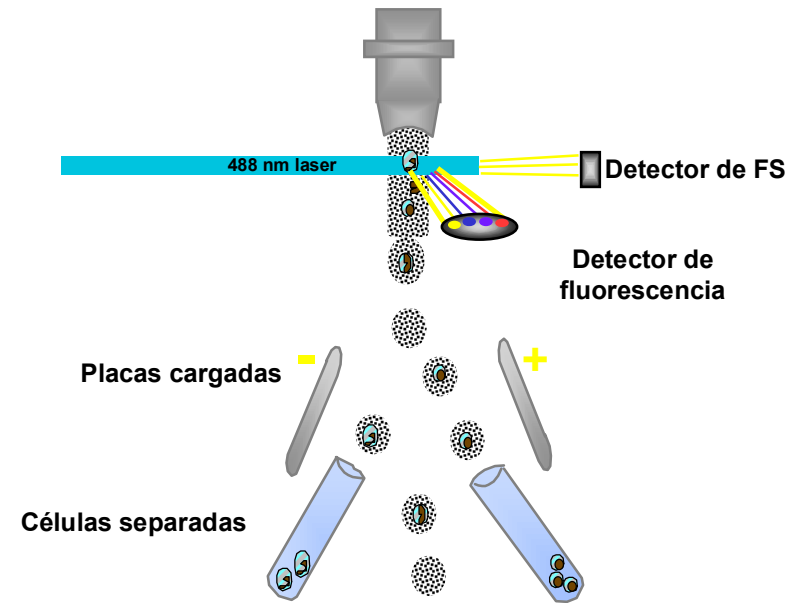
EPICS V A BORDO DE UN BARCO OCEANOGRAFICO



CITOMETRO DE FLUJO IN SITU



¿CÓMO FUNCIONA UN SEPARADOR CELULAR?



EJEMPLOS DE CELL SORTERS A LO LARGO DE LA HISTORIA



EPICS V



EPICS CS



EPICS ELITE



EPICS ALTRA



MoFlo

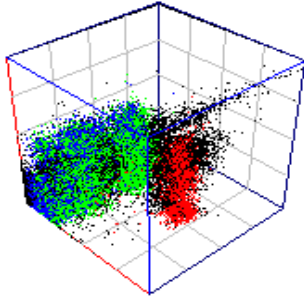


FACStar

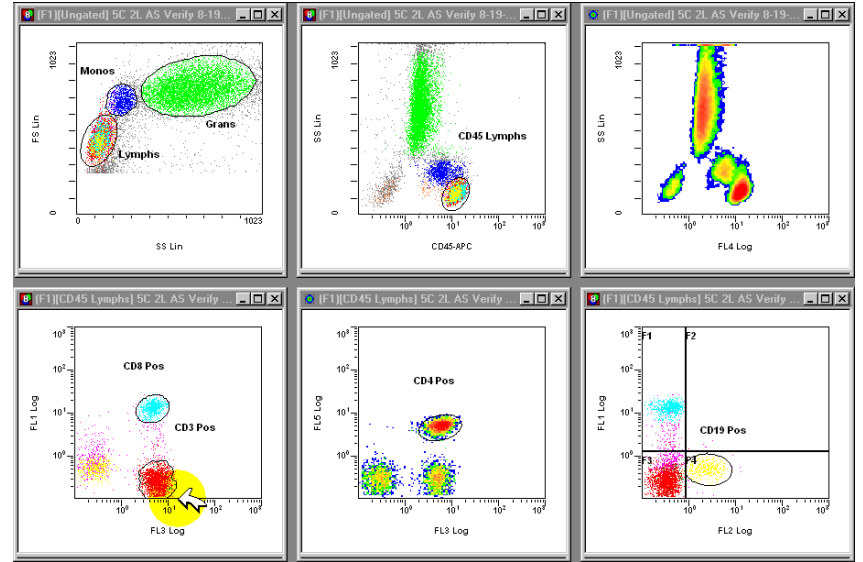


FACS Vantage

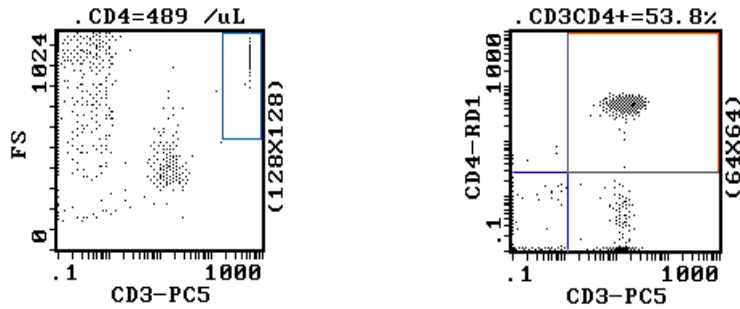
EJEMPLOS DE OBTENCION Y ANALISIS DE DATOS EN CITOMETRIA DE FLUJO



INMUNOFENOTIPO DE POBLACIONES LINFOCITARIAS

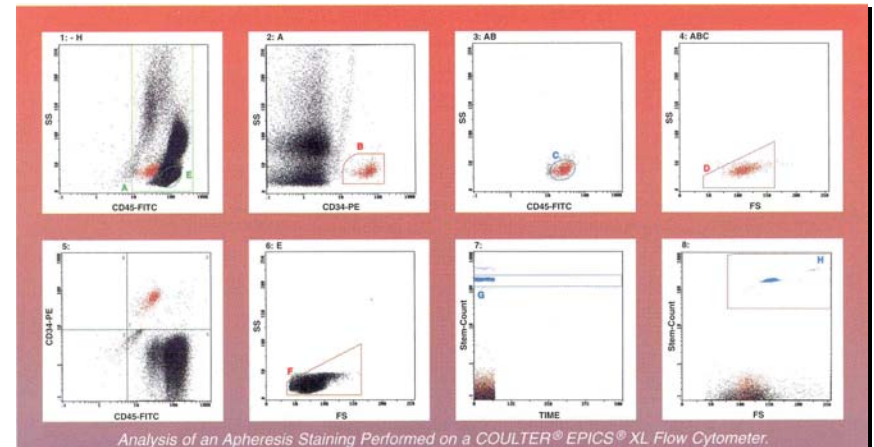


RECUENTO ABSOLUTO DE LINFOCITOS CD4 CON ESFERAS DE CONCENTRACION CALIBRADA

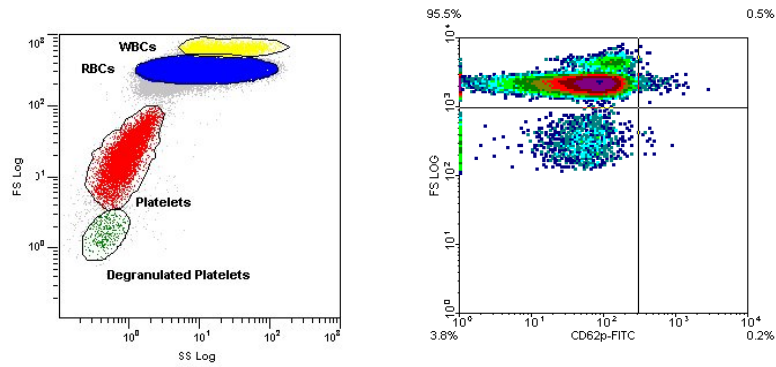


COUNTS ADJ. BY
1025/4190

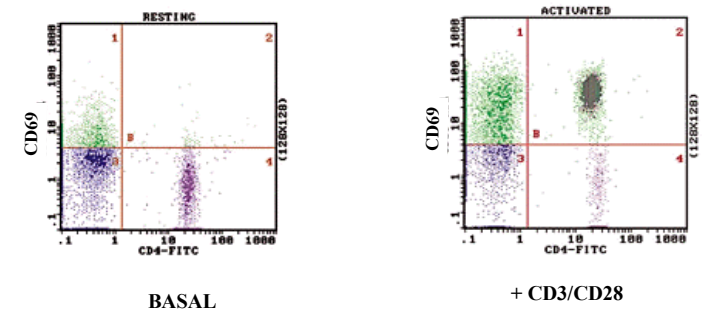
DETECCION Y CUANTIFICACION ABSOLUTA DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS CD34+



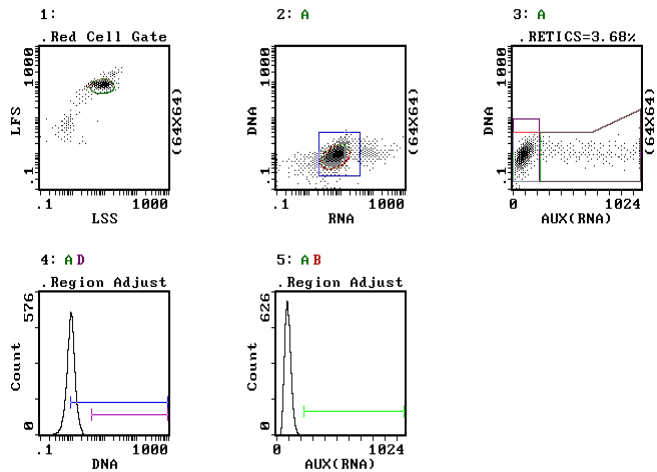
ANALISIS DE LA FUNCION PLAQUETARIA



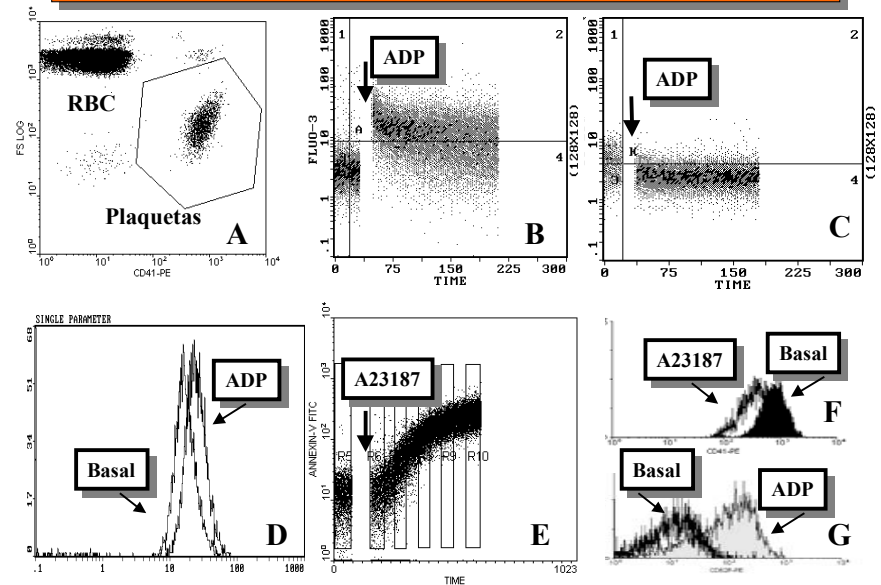
ANALISIS DE MARCADORES DE ACTIVACION EN LINFOCITOS



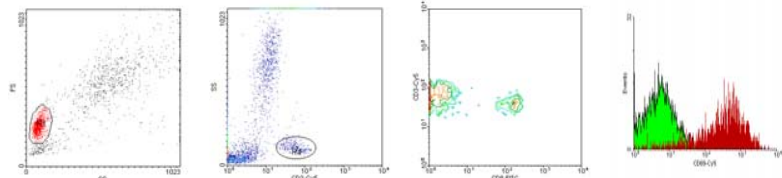
RECUESTO DE RETICULOCITOS



ANALISIS DE PARAMETROS DE ACTIVACION EN PLAQUETAS



ANALISIS DE CITOKINAS INTRACELULARES EN LINFOCITOS

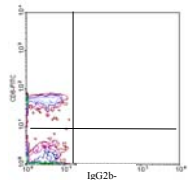


Morfología leucocitaria y selección de linfocitos

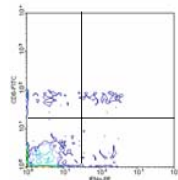
Selección de poblaciones: células T (CD3)

Selección de células T: TC (CD8+)/TH (CD8-)

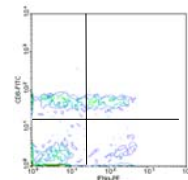
Control de activación: CD69



Control isotípico: IgG2b-PE

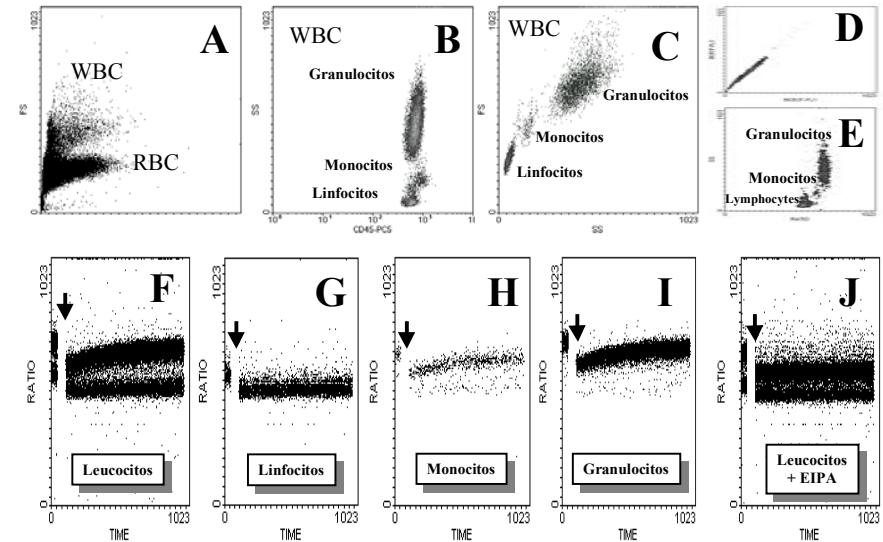


Síntesis de IFN γ : Baja



Síntesis de IFN γ : Alta

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR Na⁺/H⁺ EN LEUCOCITOS



AVANCES EN LAS APLICACIONES CLINICAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO

AVANCES EN LA IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE CELULAS

1. ANTIGENOS DE SUPERFICIE:

- Caracterización de nuevas moléculas de superficie (CD)
- Marcaje con 4-5 colores de fluorescencia
- Implementación de software de autoajuste y autocompensación
- Preparación automática de muestras para inmunofluorescencia

2. ANTIGENOS INTRACELULARES:

- Desarrollo de técnicas reproducibles de permeabilización
- Desarrollo de anticuerpos contra citocinas y enzimas
- Desarrollo de sistemas para detectar proteínas secretadas

3. ACIDOS NUCLEICOS:

- Análisis multiparamétrico del DNA y componentes celulares
- Desarrollo de anticuerpos contra productos génicos específicos
- Desarrollo de anticuerpos contra proteínas reguladoras del ciclo
- Implementación de software para ajuste del ciclo celular

AVANCES EN EL ESTUDIO FUNCIONAL DE CELULAS

1. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA INMUNIDAD:
 - Desarrollo de reactivos ("tetrámeros") para detectar linfocitos antígeno-específicos
 - Desarrollo de métodos para el análisis de la activación leucocitaria
 - Desarrollo de anticuerpos contra moléculas de adhesión leucocitarias
 - Desarrollo de fluorocromos sensibles al burst oxidativo
 - Desarrollo de métodos para el análisis de fagocitosis
 - Desarrollo de métodos para el análisis de citotoxicidad
2. FUNCIONALIDAD DE LA HEMOSTASIA:
 - Desarrollo de anticuerpos contra antígenos estructurales y dependientes de activación en superficie de plaquetas
 - Desarrollo de técnicas en sangre entera para el estudio de la activación de plaquetas
3. ANALISIS DEL METABOLISMO CELULAR:
 - Desarrollo de sustratos fluorogénicos para enzimas intracelulares
 - Desarrollo de métodos para Citoenzimología de Flujo
 - Desarrollo de fluorocromos con especificidad subcelular

AVANCES EN LAS APLICACIONES A LA TERAPEUTICA

1. MECANISMO DE RESISTENCIA A FARMACOS:
 - Desarrollo de anticuerpos contra glicoproteína P
 - Desarrollo de técnicas cinéticas para el estudio de la captación/eflujo de fármacos o análogos
 - Desarrollo de técnicas para la cuantificación de glutatión intracelular y de glutatión-S-transferasa
2. DETECCION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL:
 - Desarrollo de métodos de inmunofluorescencia múltiple
 - Implementación del análisis de eventos infrecuentes
3. INMUNOLOGIA DEL TRANSPLANTE/TRANSFUSION:
 - Desarrollo de técnicas para el estudio de histocompatibilidad
 - Implementación de la detección de anticuerpos circulantes
 - Implementación de la cuantificación de células CD34⁺
 - Desarrollo de métodos para detectar células contaminantes infrecuentes

AVANCES EN LAS APLICACIONES DE VALOR PRONOSTICO O PREDICTIVO

1. ESTABLECIMIENTO DE CONSENSOS METODOLOGICOS :
 - Inmunofenotipo de leucemias y linfomas
 - Ploidía de DNA e índice de proliferación en tumores sólidos
 - Detección y cuantificación de activación de plaquetas
 - Análisis del fenotipo MDR
2. ESTABLECIMIENTO DE CONTROLES DE CALIDAD:
 - Inmunofenotipo de superficie
 - Ploidía de DNA e índice de proliferación en tumores sólidos
 - Cuantificación de células CD34⁺
3. VALOR PRONOSTICO/PREDICTIVO DE LA CITOMETRIA:
 - Inmunofenotipo en leucemias y linfomas
 - Ploidía de DNA e índice de proliferación en algunos tumores
 - Expresión de genes relacionados con apoptosis en neoplasias
 - Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en neoplasias
 - Índice de madurez reticulocitaria en hematopoyesis

AVANCES EN EL ANALISIS DE LA LESION Y MUERTE CELULAR

1. AVANCES EN EL ESTUDIO FUNCIONAL CELULAR:
 - Desarrollo de técnicas para la cuantificación de sustratos
 - Desarrollo de técnicas de citoenzimología de flujo
 - Desarrollo de métodos de activación celular *in vitro*
2. AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR:
 - Desarrollo de técnicas de detección y cuantificación de apoptosis
 - Desarrollo de métodos para el estudio de los mecanismos moleculares de la apoptosis
 - Establecimiento del valor predictivo/pronóstico de la apoptosis en neoplasias e inmunodeficiencias
 - Establecimiento del valor predictivo/pronóstico de la apoptosis en la respuesta a la terapéutica