



“2025, Año de la Mujer Indígena”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo y hasta el 30 de junio de 2025, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____

Cargo: _____

Institución o empresa: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Correo electrónico: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA 0150. CITOMETRÍA DE FLUJO		
La citometría de flujo es una sofisticada tecnología que permite realizar un análisis rápido y multiparamétrico de partículas en suspensión al hacer incidir uno o varios láseres sobre éstas cuando pasan a través de un capilar mediante un flujo laminar. La manera en la que dichas partículas dispersan la luz permite determinar características físicas como son: el tamaño, la complejidad, y la fluorescencia emitida después de haber sido excitada por un haz de luz si las células son teñidas con algún colorante o son reconocidas por un anticuerpo (el cual se encuentra acoplado a un fluorocromo).		
Esta técnica permite la cuantificación automatizada de diferentes parámetros para una gran cantidad de células individuales durante cada sesión de análisis. Por ejemplo, 100 000 partículas o más (prácticamente ilimitadas) son analizadas una tras		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
otra, en aproximadamente un minuto. El límite de detección puede llegar a ser hasta 100 moléculas fluorescentes por célula.		
Usos y aplicaciones		
El principal atributo de la citometría de flujo es su versatilidad, ya que permite realizar múltiples ensayos funcionales, metabólicos y estructurales. Entre las múltiples aplicaciones de esta técnica se encuentran la detección de moléculas en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células, DNA, RNA, cromosomas, citocinas, quimiocinas, hormonas y proteínas. También permite hacer análisis de proliferación celular, citotoxicidad, ciclo celular, flujo de calcio, polimerización de proteínas, identificar la interiorización de anticuerpos, estudiar la señalización intracelular y viabilidad celular.		
Se emplea de manera habitual en investigación básica en biología molecular y celular, inmunología, biología del cáncer y la investigación de enfermedades. Entre sus principales aplicaciones destaca la inmunofenotipificación, que consiste en utilizar anticuerpos conjugados con fluorocromos dirigidos contra múltiples antígenos de la superficie celular, con la finalidad de identificar distintas poblaciones celulares. Además, resulta de gran utilidad en el descubrimiento y desarrollo de biológicos/biotecnológicos, donde ha sido la técnica elegida para medir la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), entre otras,		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
además de permitir la selección de líneas sobre productoras		
Citómetro de flujo		
Los citómetros de flujo están constituidos por tres sistemas: el sistema de fluidos, el sistema óptico y el sistema electrónico. Existen dos tipos de citómetros de flujo, aquellos en los que únicamente pueden realizarse adquisiciones basadas en la dispersión de luz y la emisión de fluorescencia y los citómetros que además pueden separar, clasificar y aislar células (<i>cell sorters</i>).		
El enfoque, ampliación y elección de fuentes de luz se optimizan para permitir la detección automática y medición de las diferencias morfológicas y los patrones de tinción. Para un análisis adecuado se requiere hacer una selección correcta de la fuente de luz dependiendo de los parámetros a evaluar, además de ajustar los parámetros del instrumento dependiendo de la muestra a analizar (cultivos celulares, leucocitos, plaquetas, bacterias o levaduras) y la información que se desea obtener (fenotipificación, ciclo celular, apoptosis, citocinas, fluidez de la membrana y proteínas fluorescentes).		
Sistema de fluidos y celda de flujo.		
Cada partícula de la muestra es expuesta a la fuente de luz y detectada en la celda de flujo. El sistema de fluidos transporta las partículas en suspensión de manera individual en un flujo laminar desde el tubo hasta el punto de intercepción con el láser. Para conseguir esto, el fluido envolvente genera que la muestra quede en		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>hilo (enfoque hidrodinámico). Al mismo tiempo, el haz de luz es enfocado de forma elíptica mediante dos lentes con focales hacia el canal de la celda de flujo por donde pasan las células. La tasa de flujo debe ser constante y debe garantizar una distancia adecuada entre las células para asegurar la separación de éstas y el conteo adecuado.</p>		
<p>Fuentes de luz</p>		
<p>Dentro de las fuentes luminosas más comunes en citometría se encuentran las lámparas (mercurio, xenón), los láseres de alto poder enfriados con agua (argón, kriptón), los láseres de bajo poder enfriados con aire (argón (488 nm), helio-neón rojo (633 nm), helio-neón verde, helio-cadmio (UV) y los diodos (azul, verde, rojo, violeta).</p>		
<p>Detección de la señal</p>		
<p>Cuando una partícula pasa por el haz de luz, dispersa una parte de la luz en distintas direcciones. Cuando se emplean compuestos fluorescentes, estos emiten su propia luz (fluorescencia), la cual también irradia en todas las direcciones. Por lo tanto, dos tipos de señales pueden generarse: aquella dependiente de la dispersión de la luz incidente y, la proveniente de la excitación de moléculas fluorescentes. Los detectores del equipo recolectan parte de esta luz fluorescente y dispersada y producen señales eléctricas proporcionales a la cantidad de luz recolectada.</p>		
<p>En cuanto a la dispersión de la luz, dos parámetros son medidos basándose tanto en la forma en que</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>la luz se dispersa de frente [<i>Forward Scatter (FS)</i>] como en la cantidad de luz dispersada en un ángulo de 90° partiendo del punto de incidencia del haz de luz [<i>Side Scatter (SS)</i>].</p>		
<p>El FS proporciona información relacionada con el tamaño celular, mientras que el SC refleja la complejidad de las partículas analizadas y es influenciado por parámetros como la forma del núcleo, cantidad y tipo de gránulos citoplasmáticos o la estructura de la membrana, de tal manera que un incremento en la intensidad del SS indica una mayor complejidad celular. Las señales de dispersión siempre serán generadas pues reflejan cualidades intrínsecas de las partículas analizadas.</p>		
<p>Dependiendo del tipo y número de fuentes luminosas, cuando una célula pasa por el láser, emitirá fluorescencia. Las señales fluorescentes provienen de fluorocromos que se encuentran de manera natural en las células o de moléculas fluorescentes con las que se tiñen las células. En la actualidad existe una gran variedad de fluorocromos, lo cual incrementa las posibles combinaciones al realizar un análisis multiparamétrico. Sin embargo, los filtros ópticos deben adaptarse a los fluorocromos empleados, puesto que cada fluorocromo posee un espectro de excitación y emisión propio. Por ello, los fluorocromos se deben elegir con base en la fuente de excitación disponible, el sistema de detección del equipo y el propósito específico del análisis.</p>		
<p>Manejo y conversión de las señales de analógicas a digitales.</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Las señales de dispersión y fluorescencia emitidas por las células se separan y se envían al detector correspondiente mediante filtros ópticos. Los detectores son transductores (tubos fotomultiplicadores (PMT)) que convierten las señales luminosas emitidas por las células en pulsos de voltaje.</p>		
<p>El proceso de contar cada pulso en el canal adecuado se conoce como conversión analógica a digital (ADC de sus siglas en inglés). El resultado de esta transformación se muestra como un histograma de frecuencia.</p>		
<p>Amplificación de la señal</p>		
<p>Los pulsos de voltaje requieren ser amplificados para visualizarse de manera óptima. El proceso de amplificación acentúa las diferencias entre las señales celulares y en consecuencia aumenta la resolución entre las diferentes poblaciones celulares con características distintas (células viables de células no viables, fluorescencia no específica de fluorescencia antigénica específica después de teñir la muestra con anticuerpos monoclonales).</p>		
<p>Existen dos métodos de amplificación, la lineal y la logarítmica. La elección entre una u otra se hace con base en las características morfológicas y la tinción empleada (anticuerpos monoclonales, tinciones de ácidos nucleicos, etc).</p>		
<p>La amplificación lineal, la cual potencia las diferencias entre pulsos fuertes, se usa para aquellos parámetros que generan señales de alta</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
intensidad como la dispersión celular o la fluorescencia derivada de tinciones de ácidos nucleicos para estudios de ciclo celular.		
La amplificación logarítmica, en cambio , se emplea para pulsos débiles y también para parámetros o condiciones de análisis que pueden generar pulsos tanto débiles como fuertes, por ejemplo:		
<ul style="list-style-type: none"> • Antígenos celulares. • Dispersión de plaquetas, bacterias y levaduras. • Fluorescencia derivada de tinciones de ácidos nucleicos para evaluar apoptosis. 		
Compensación		
Cada fluorocromo posee un espectro de excitación con una longitud de onda determinada y un espectro de emisión con una longitud de onda mayor. Cuando se emplean dos o más fluorocromos simultáneamente, el espectro de dichos fluorocromos puede empalmarse. En consecuencia, cada detector captará la fluorescencia específica que le corresponda y una porción de la fluorescencia emitida por los otros fluorocromos. Esto da como resultado una sobrevaluación de la señal y una pobre separación de las poblaciones celulares. y por consiguiente una difícil interpretación de los resultados.		
La solución para esta limitante es el uso de una matriz electrónica que permite la resta selectiva de la interferencia de cada señal fluorescente después		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
de que fue captada por el detector (compensación de la fluorescencia).		
La compensación requiere el uso de calibradores fluorescentes, preferentemente células positivas teñidas con los fluorocromos de interés, combinadas de manera equivalente con aquella del anticuerpo empleado para el análisis.		
Tipos de gráficos y visualización de las señales.		
Después de la amplificación y compensación, las señales se representan en 2 o 3 dimensiones. Los histogramas muestran las intensidades de la señal frente a los recuentos de células para un parámetro determinado. Los gráficos de puntos, en los que cada punto representa una célula, resultan de la combinación de 2 intensidades de señal (gráficos de puntos de dos parámetros). El tipo y número de gráficos y combinaciones de señales se eligen en función de las muestras y los fluorocromos utilizados. Al analizar los datos adquiridos, el software de citometría de flujo también puede generar otros tipos de gráficos como superposiciones, gráficos de superficie, gráficos de contorno, gráficos de densidad, entre otros. También se pueden utilizar datos estadísticos como la intensidad media de fluorescencia y sus cambios en el tiempo o su dependencia de la función celular.		
Citometría de espectro completo.		
Si bien la citometría convencional permite realizar análisis de más de 30 parámetros en una misma		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>muestra, su mayor limitante radica en que su sistema óptico recolecta únicamente un fragmento del espectro de emisión de los fluorocromos. Esto provoca que las combinaciones de fluorocromos sean limitadas y que se requiera una mayor compensación para lograr distinguir las señales de cada fluorocromo. Con la finalidad de aprovechar al máximo el potencial de la citometría, en los últimos años se ha iniciado la transición hacia el uso de la citometría de espectro completo. Este avance permite una mayor flexibilidad en el diseño de paneles y un mayor aprovechamiento de la señal de emisión ya que, como su nombre lo indica, es capaz de registrar el espectro de emisión completo de cada fluorocromo empleado. Esto ha permitido incrementar la complejidad de los paneles y como consecuencia obtener más información a partir de una muestra.</p>		
<p>Análisis de Datos</p>		
<p>Dentro de las suspensiones celulares que se van a analizar pueden estar presentes diferentes tipos de poblaciones celulares, algunas de las cuales no son deseadas (como células muertas, desechos o agregados) o simplemente no son relevantes para el análisis. Esto depende del tipo de muestra celular (sangre total, médula ósea, cultivos celulares, fluidos biológicos, suspensiones celulares de tejidos sólidos) y de los procedimientos de manipulación (métodos de tinción, lisis, fijación, criopreservación, descongelación, tejido incluido en parafina). Como consecuencia, no todas las señales</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>generadas durante un análisis de citometría de flujo pertenecen a las células que se van a estudiar. Se adoptan 2 estrategias para excluir señales celulares no deseadas e irrelevantes.</p>		
<p>La primera se utiliza durante la adquisición de datos. Es un umbral de ruido, aplicado a 1 (o más) parámetros significativos, configurado para adquirir solo las células con intensidades de señal superiores al valor de discriminación predefinido para ese parámetro. Debido a sus características de señal fuerte con un bajo grado de interferencia, FS es el parámetro más utilizado como discriminador.</p>		
<p>La segunda se aplica durante el análisis de datos y consiste en el uso de regiones para restringir el análisis solo a señales de aquellas poblaciones que satisfacen determinadas características morfológicas y de perfil de expresión. Normalmente se utilizan dos tipos de regiones, la primera es la basada en la morfología, donde las poblaciones de células se identifican utilizando sus señales FS y SS. Se dibuja una región alrededor de la población de interés (por ejemplo, linfocitos, células viables) y posteriormente las gráficas de fluorescencia se generan a partir de esta región seleccionada; la segunda es la selección basada en fluorescencia. La población celular de interés se identifica en función de la intensidad de expresión de un antígeno o un fluorocromo, luego se dibuja una región a su alrededor.</p>		
<p>Luego, las gráficas de fluorescencia se generan a partir de la región seleccionada.</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
El software de análisis permite la creación de múltiples regiones, utilizando un orden lógico secuencial. Esta característica es especialmente útil cuando se estudian poblaciones de células raras o con fines de clasificación.		
Controles		
El control interno consiste en la validación de la alineación óptica del sistema previo al análisis utilizando perlas con fluorocromos y se verifica la estabilidad del flujo. Se debe realizar la revisión periódica de los valores de control.		
Adicional a la verificación del funcionamiento adecuado del equipo, se recomienda el uso de controles positivos que demuestren que el anticuerpo de prueba es funcional y compatible con la configuración del citómetro de flujo. El control positivo debe incluir muestras que se sepa que son positivas para el marcador de interés.		
A manera de control externo, con la finalidad de garantizar la confiabilidad de los datos obtenidos o para verificar la reproducibilidad entre laboratorios, se recomienda la participación en un estudio de ensayo de aptitud.		

* Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.