UTILIZACIÓN DE MUESTRAS PARA EL USO DE LA PLATAFORMA DE CITOMETRÍA DE FLUJO:

En este documento trataremos de definir una serie de recomendaciones para la elección adecuada de las condiciones específicas de la muestra y hacer un buen uso de los Citómetros de Flujo. La preparación de la muestra es muy importante y se deben cumplir con los requisitos básicos para el análisis de células / partículas.

Los aspectos más importantes en el uso de la Plataforma de Citometría de Flujo son:

- Tipo celular: Es importante conocer bien la muestra y tamaño de las poblaciones tanto para la configuración del equipo como para su buen uso y evitar problemas en la adquisición (por ejemplo, atascos). En general, se recomienda que el tamaño de cualquier célula o partícula sea 0,5-50 micras, si bien dependiendo del equipo a utilizar este tamaño puede variar desde 0,2-100/150 micras.

- Fluorescencias: Para una correcta obtención de datos, es imprescindible un buen diseño de paneles y definir los controles necesarios. Por tanto, es necesario conocer el equipo y las fluorescencias a utilizar para seleccionar y definir los láseres, los filtros, los controles de fluorescencia, etc.

- Concentración de las muestras y abundancia de nuestra población de interés: Es necesario conocer tanto la concentración de la suspensión de células/partículas recomendada para cada equipo y el número de células necesarias y pureza requerida para definir, la velocidad, cantidad de muestra, etc.

- Agentes biológicos de la muestra: es imprescindible notificar al Responsable de la Plataforma el agente biológico a manejar para tomar las medidas oportunas en caso que fueran necesarias.

Recomendación de parámetros importantes de la preparación de muestras:

- Es importante adquirir suspensiones unicelulares (evitando agrupaciones celuares) para evitar obstrucciones de los equipos, independientemente del tipo de muestra. Generalmente las células mononucleares de sangre periférica y algunas líneas celulares cumplen con este requisito. En el caso de células obtenidas a partir de órganos sólidos deben prepararse adecuadamente para obtener una suspensión de células individuales.

- La concentración de las muestras dependerá del tipo celular: En líneas celulares, cultivos primarios adherentes o células de gran tamaño podría ser recomendable una suspensión de 4-6 millones de células/ml aproximadamente y en células primarias no adherentes de 20 millones de células/ml. Estas

concentraciones son estimadas y difíciles de ajustar ya que dependen de la muestra. Las recomendaciones específicas para los citómetros disponibles en la Plantaforma serían:

- FACS Calibur: El rango recomendado de concentración de las muestras en es de 1 x 10^5 a 2 x 10^7 células-partículas/ml.
- FACS Celesta: Este citómetro no dispone de rango recomendado de concentración en sus especificaciones, podríamos asumir el mismo que el FACS Calibur debido a su similitud.
- Navios: La concentración óptima de las muestras es de 5 x 10^6 células/ml.

- En el caso de células adherentes es muy importante tripsinizar bien para evitar agregados celulares.

- Es importante tener una muestra con el menor número de células muertas o dañadas (a no ser que requiramos este dato) y eliminar "contaminantes". Por ello, y para obtener unos buenos resultados, es interesante y recomendable filtrar la muestra con un filtro de 30 ó 70 um (en función de nuestra muestra y tamaño celular).

- Se deben evitar centrifugaciones excesivas para evitar la granulación de las células.

- Se deben seguir las recomendaciones específicas de cada equipo y solicitar los protocolos e instrucciones al Responsable de la Plataforma.

- En el caso de que las muestras contengan un agente biológico de riesgo, estas deberán ser fijadas.