

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 evitar problemas en la adquisición. 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.
- Settings: para una correcta obtención de datos, es imprescindible un buen diseño experimental, controles y panel adecuado. Para todo ello hay que tener en cuenta la configuración de los equipos disponibles (láseres y filtros).
- 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, el número de células necesarias y la pureza requerida para definir, la velocidad, cantidad de muestra, etc. Dicho esto, siempre se comprobará su adecuación de manera empírica.
- 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 (quedará recogido en la documentación de alta de usuarios). En el caso de que las muestras contengan un agente biológico de riesgo, estas deberán ser fijadas.

Recomendación de parámetros importantes de la preparación de muestras:

- Es importante adquirir suspensiones unicelulares (evitando agrupaciones celulares) 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 o cultivos adherentes, 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 Plataforma serían:
 - FACSCalibur: El rango recomendado de concentración de las muestras es de 1×10^5 a 2×10^7 células-partículas/ml.
 - FACSCelesta: Este citómetro no dispone de rango recomendado de concentración en sus especificaciones, podríamos asumir el mismo que el FACSCalibur debido a su similitud.
- En el caso de células adherentes es muy importante la incubación con tripsina o similares 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 μm (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 y haber cursado la capacitación correspondiente antes de usar cualquier equipo de la Unidad.