

Citometría de flujo

Halima Moncrieffe, University College London, Reino Unido

Traducción: Jesús Gil, Würzburg, DE (SEI)

La citometría de flujo es una técnica muy potente que permite analizar múltiples parámetros en una célula. Las poblaciones celulares se pueden caracterizar mediante el uso de combinaciones de antígenos tanto de superficie como intracelulares. Existe un gran número de aplicaciones prácticas que los inmunólogos utilizan de forma regular como el inmunofenotipaje, determinación de la producción de citocinas intracelulares, proliferación celular, viabilidad celular y análisis del ciclo celular, estudio de poblaciones extrañas, células troncales y proteínas fluorescentes. La separación celular basada en citometría de flujo (*sorting*) se utiliza para separar células en distintas poblaciones de interés.

Un vistazo a la citometría de flujo

La tecnología de citometría de flujo se basa en la medición de la fluorescencia asociada a las células que han sido previamente marcadas con anticuerpos monoclonales ligados a fluorocromos, como por ejemplo CD3-FITC. A veces también se mide la disminución de sondas fluorescentes, como en el caso de CFSE durante proliferación celular.

Entendiendo la tecnología de citometría de flujo

Los citómetros hacen pasar las células de una en una a través de un láser, detectan la fluorescencia y las propiedades de dispersión de la luz y almacenan esta información para análisis posteriores.

Existen diversos láseres de uso común, y se nombran en función de la longitud de onda, o color, que emiten: 488nm (láser de argón azul), 633nm (láser rojo HeNe), 405nm (láser violeta), 532nm (láser verde) y 360nm (láser UV).

En la actualidad existen fluorocromos y conjugados comerciales (tinciones tandem) que se excitan específicamente por un solo tipo de láser. Algunos fluorocromos típicos son FITC, PE, PerCP, APC y Pacific Blue; entre los "tandem" más usados se encuentran PerCP-Cy5.5 y APC-Cy.7).

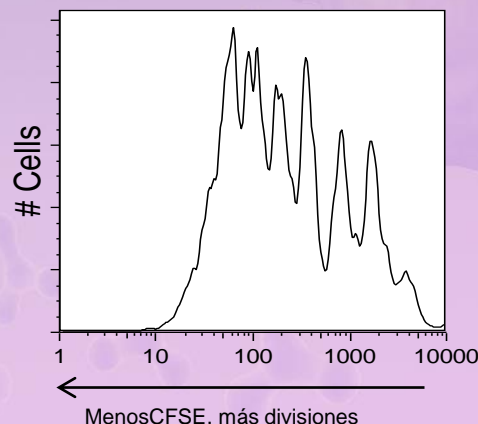
La citometría de flujo para los inmunólogos

Existe una amplia variedad de aplicaciones para la citometría de flujo en inmunología, como por ejemplo el seguimiento de células T específicas de antígeno a partir de un gran número de células totales. Se puede obtener más información a partir de la tinción con múltiples marcadores antigénicos. Por ejemplo, cuando se investigan las células T reguladoras, es muy útil usar un panel de anticuerpos como CD39-FITC, FoxP3-PE, CD4-PerCP, CD3-PeCy7, CD25-APC.

Es muy importante ajustar los parámetros del citómetro y compensar correctamente para evitar solapamientos entre las emisiones de cada uno de los fluorocromos.

Para ello se usan controles que constan de células que no han sido teñidas, fluorocromos individuales (solo un anticuerpo cada vez), y "fluorescencia menos uno" (FMO) donde todos los anticuerpos del panel se añaden a las células, excepto el que queremos estudiar.

CFSE como un marcador de la división celular. Las células T CD4⁺ son marcadas con CFSE y estimuladas *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28. Después fueron analizadas por citometría de flujo en el día 7. Cada pico representa una población de células que ha sufrido el mismo número de divisiones.



Producción intracelular de citocinas. Dot plot de células periféricas de la sangre humana seleccionando células T CD3⁺. La producción de IL-17 está restringida a la población CD4⁺.

