

**ANALISIS CITOMETRICO DE LA PRODUCCION DE
ESPECIES OXIDANTES EN LEUCOCITOS
AISLADOS DE SANGRE PERIFERICA**

1. Material:

Sangre entera anticoagulada
Hidroetidina (HE, Sigma): 1 mg/ml en DMSO
Dihidrorhodamina 123 (DHRH123, Sigma): 1 mg/ml en DMSO
Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)
Medio de cultivo RPMI (Sigma)
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Tubos de polipropileno de 12x75 mm
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Dispensar 800 μ l de Ficoll (mantenido a temperatura ambiente) en un tubo eppendorf de 1.5 ml colocado verticalmente sobre una gradilla estable
2. Dispensar cuidadosamente 500 μ l de sangre entera anticoagulada, evitando que se mezcle con el Ficoll.
3. Dejar reposar durante 15-20 minutos el tubo abierto para que los eritrocitos se agreguen en presencia del Ficoll y precipiten a gravedad normal.
4. Cuando hayan precipitado los eritrocitos, aspirar cuidadosamente alícuotas de 100 μ l de la parte superficial de la capa superior.
5. Dispensar cada alícuota en un tubo de 12x75 mm y diluir 1/10 (900 μ l) con medio RPMI a 37°C.
6. Añadir a cada tubo 5 μ l de HE Y 5 μ l de DHRH123 (concentración final: 5 μ g/ml de cada fluorocromo) e incubar durante 10 minutos exactamente en semioscuridad.
9. Analizar inmediatamente por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Se recomienda proceder al análisis lo antes posible tras la extracción de las muestras (no más tarde de 4 horas aproximadamente).
2. La agitación, incubación prolongada y la luz intensa provocan la activación de los granulocitos.

ANALISIS SIMULTANEO DE LA FAGOCITOSIS Y BURST OXIDATIVO EN LEUCOCITOS AISLADOS

1. Material:

Sangre entera anticoagulada

Suspensión de levaduras (Zimosan, Sigma) fluorescentes opsonizadas con suero AB (Zimosan-FITC)

Hidroetidina (HE, Sigma): 1 mg/ml en DMSO

Dihidrorhodamina 123 (DHRH123, Sigma): 1 mg/ml en DMSO

Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)

Medio de cultivo RPMI (Sigma)

Tubos eppendorf de 1.5 ml

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Dispensar 800 μ l de Ficoll (mantenido a temperatura ambiente) en un tubo eppendorf de 1.5 ml colocado verticalmente sobre una gradilla estable
2. Dispensar cuidadosamente 500 μ l de sangre entera anticoagulada, evitando que se mezcle con el Ficoll.
3. Dejar reposar durante 15-20 minutos el tubo abierto para que los eritrocitos se agreguen en presencia del Ficoll y precipiten a gravedad normal.
4. Cuando hayan precipitado los eritrocitos, aspirar cuidadosamente alícuotas de 100 μ l de la parte superficial de la capa superior.
5. Dispensar cada alícuota en un tubo de 12x75 mm y diluir 1/10 (900 μ l) con medio RPMI a 37°C. Incluir un tubo para el control de activación espontánea (en ausencia de levaduras).
6. Añadir a cada tubo 5 μ l de HE (concentración final: 5 μ g/ml) e incubar durante 10 minutos exactamente.
7. Añadir 10 μ l de zimosan-FITC al tubo correspondiente.
8. Incubar 15 minutos a 37°C en semioscuridad.
9. Analizar inmediatamente por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Se recomienda proceder al análisis lo antes posible tras la extracción de las muestras (no más tarde de 4 horas aproximadamente).
2. La agitación, incubación prolongada y la luz intensa provocan la activación de los granulocitos.
3. La concentración de las suspensiones de levaduras fluorescentes puede ser determinada en el citómetro de flujo utilizando un protocolo de contaje absoluto.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION EN LEUCOCITOS

1. Material:

Sangre entera anticoagulada

Reactivo Immuno-Prep y sistema de preparación Q-Prep (Coulter)

Anticuerpos conjugados con FITC o PE (Immunotech) contra moléculas de adhesión de la familia de las integrinas (CD18, CD11a, CD11b, CD11c) o selectinas (CD62L).

Estímulos de activación leucocitaria:

- N-formil-Met-Leu-Phe (FMLP, Sigma):
- Forbol-12-miristato Acetato (PMA, Sigma):
- Lipopolisacárido bacteriano (LPS, Sigma):

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Baño termostatzado a 37°C

Baño de hielo

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular tubos de 12x75 mm, incluyendo un tubo por cada estímulo a usar y un tubo de control para la activación espontánea
2. Dispensar 100 µl de sangre entera en cada tubo, procurando que quede depositada en el fondo del tubo.
3. Dispensar a cada tubo 5 ml de los anticuerpos correspondientes, de acuerdo con la combinación de moléculas de adhesión que se desee investigar.
4. Añadir el estímulo de activación correspondiente a cada tubo.
5. Incubar durante 15 minutos.
6. Detener la activación introduciendo los tubos en hielo.
7. Lisar los eritrocitos y estabilizar la suspensión de leucocitos con el sistema Immuno-Prep.
8. Analizar por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. El uso de sangre entera minimiza la activación artefactual de los granulocitos y monocitos.
2. La fijación de las muestras permite aplazar su análisis hasta 48 horas, si se mantienen en nevera y oscuridad.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DE MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETARIA

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato

Tampón de Tyrode

PBS (opcional)

Anticuerpos monoclonales CD41-PE y CD62-FITC (Immunotech)

Agonistas de activación plaquetaria:

- ADP 400 μ M
- Trombina 10 U.I./ml

Inhibidor de la coagulación:

- Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) 50 U.I./ml

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Diluir 1/10 la sangre entera con tampón Tyrode (25 μ l de sangre + 225 μ l de tampón).
2. Rotular tubos de 12x75 mm, incluyendo un tubo para el control de activación espontánea (sin agonista).
3. Dispensar en cada tubo 25 μ l de sangre diluída y 5 μ l de cada anticuerpo.
4. Dispensar 4 μ l de GPRP sólo en el tubo de activación con trombina.
5. Mezclar el contenido de cada tubo por agitación suave.
6. Añadir a cada tubo el volumen indicado del agonista correspondiente.
7. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos.
8. Añadir a cada tubo 1 ml de tampón Tyrode (o PBS) a temperatura ambiente.
9. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (hasta 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torniquete y desechando los primeros mililitros.
3. El frío incrementa la activación plaquetaria por lo que la dilución final (paso 8) debe hacerse con tampón a temperatura ambiente.
4. Si no se puede analizar inmediatamente la muestra, se puede fijar la suspensión diluída (paso 7) con paraformaldehído 2% en PBS y mantener en nevera durante 24-48h.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA LIBERACION DE CALCIO CITOSOLICO EN PLAQUETAS

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato
Tampón de Tyrode con 0.35% BSA
Fluo-3 AM (Sigma): 1mM en DMSO
Anticuerpo monoclonal CD41-PE (Immunotech)
Agonistas de activación plaquetaria:
- ADP
- Trombina
- Colágeno
Inhibidor de la coagulación: GPRP
Baño termostatzado a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular un tubo de 12x75 mm por muestra. Dispensar 50 µl de sangre + 450 µl de tampón (dilución 1/10).
2. Añadir 2.5 µl de Fluo-3 AM a cada tubo.
3. Incubar 15 minutos a 37°C en semioscuridad.
4. Rotular 3 tubos por muestra.
5. Dispensar 15 µl de sangre diluida marcada con Fluo-3.
6. Añadir 5 µl de CD41-PE a cada tubo.
7. Dispensar 4 µl de GPRP sólo en el tubo de activación con trombina
7. Incubar a 37°C y en oscuridad durante 15 minutos.
8. Añadir a cada tubo 500 µl de tampón Tyrode a 37°C.
9. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente:
10. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
11. A los 15 segundos, detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el volumen del agonista correspondiente.
12. Colocar rápidamente el tubo en el citómetro y reanudar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado.

Sugerencias

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (hasta 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torniquete y desechando los primeros mililitros.
3. Para evitar el arrastre de plaquetas activadas entre dos análisis consecutivos, se recomienda intercalar tubos de sangre diluida entre muestras activadas, adquiriendo durante 15-30 segundos y abortando el análisis.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA LIBERACION DE CALCIO CITOSOLICO EN LINFOCITOS

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato

Linfocitos esplénicos de ratón

Timocitos de ratón

Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)

Solución de Hanks con 1 mM Cl_2Ca , 1 mM Cl_2Mg y 1% SBF(inactivado) o 0.5% BSA (solución de Hanks-Ca-Mg-Proteína)

Fluo-3 AM (Sigma): solución stock de 1mg/mL en DMSO

Mantener congelado en alícuotas a -20 o -80°C

Yoduro de propidio (Sigma, Molecular Probes): 1 mg/mL en agua bidestilada

Ionicina (Sigma): 1 mg/mL en DMSO

Baño termostatzado a 37°C

Centrífuga clínica

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Proceder a la obtención de suspensiones de linfocitos humanos (aislamiento de células mononucleares con Ficoll) o de ratón (disgregación de bazo o timo y resuspensión): 10^6 células/mL de solución de Hanks-Ca-Mg-Proteína
2. Dispensar 1 mL de la suspensión celular en tubos de polipropileno 12x75 mm
3. Añadir Fluo-3 AM a cada tubo: para establecer la concentración óptima de Fluo-3, probar el rango de concentraciones 1-5 $\mu\text{g/mL}$ (1-5 μL de solución stock)
4. Incubar 30 minutos a 37°C en semioscuridad.
5. Centrifugar la suspensión celular: 5 min x 180 g
6. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender el botón celular en 1 mL de solución de Hanks-Ca-Mg-Proteína.
7. Dejar las células en oscuridad y temperatura ambiente hasta el momento del análisis (alrededor de 15 minutos después).
8. Añadir 5 μL de solución de yoduro de propidio para excluir células muertas.
8. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente:
9. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
10. A los 15 segundos, detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el volumen del agonista correspondiente.
11. Colocar rápidamente el tubo en el citómetro y reanudar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado (300 segundos típicamente).

Sugerencias

1. No se deben utilizar concentraciones saturantes de Fluo-3, pues pueden enmascarar los movimientos reales de calcio
2. Se puede comprobar que la concentración de Fluo-3 no es saturante añadiendo ionicina (conc. final: 2 $\mu\text{g/mL}$) y observando un aumento de fluorescencia.

ACTIVACION DE LINFOCITOS PARA EL ANALISIS CITOMETRICO DE CITOKINAS INTRACELULARES

1. Material:

Sangre entera anticoagulada

Suspensiones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Medio de Cultivo RPMI 1640

Ionóforos de Calcio:

- Ionomicina (Sigma): 1 mg/mL en DMSO

- Ionóforo A23187 (Sigma): 1 mg/mL en etanol

Acetato de Forbol Miristato (PMA, Sigma): 1 mg/mL

Inductores específicos de la síntesis de citokinas/quimiokinas:

- anticuerpo CD3

- anticuerpo CD28

- IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Pharmingen)

- IL-4 humana recombinante (rhIL-4, Pharmingen)

- IFN- γ humano recombinante (rhIFN γ , Pharmingen)

- Lipopolisacárido bacteriano (LPS, Sigma)

Bloqueantes del transporte de proteínas:

- Brefeldina A (Sigma) o GolgiPlugTM (Pharmingen)

- Monensina (Sigma) o GolgiStopTM (Pharmingen)

Placas de cultivo de pocillos múltiples

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Agitador de tubos (vórtex)

Incubador a 37°C/5% CO₂

2. Procedimiento de activación en sangre entera:

1. Diluir 1:1 vol/vol la sangre entera con medio RPMI 1640 y mezclar bien.
2. Añadir una de las siguientes combinaciones de activadores:
PMA 50 ng/mL + Ionomicina 1 μ M
PMA 50 ng/mL + ionóforo A23187 1 μ g/mL
en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
3. Agitar brevemente en el vórtex para mezclar bien.
4. Repartir en alícuotas de 200 μ l en tubos de polipropileno de 12x75 mm.
5. Incubar de 4 a 6 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂
6. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3. Procedimiento de inducción de citokinas específicas:

1. Obtener suspensiones de PBMC o de células CD4+ o CD8+ purificadas (sobre todo para la inducción de IL-5 e IL-13).
2. Dispensar alícuotas de 10⁶ células en cada pocillo de la multiplaca.
3. Procesar las muestras de acuerdo con el patrón de citokinas a inducir:

3.1 Inducción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 y GM-CSF:

1. Recubrir la superficie de los pocillos con anticuerpo CD3 (10 µg/mL)
2. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
3. Añadir la siguiente mezcla de activadores:
 - Anticuerpo CD28: 2 µg/mL
 - rhIL-2: 10 ng/mL
 - rhIL-4: 20 ng/mL
4. Incubar durante 2 días en estufa a 37°C y 5% CO₂ .
5. Lavar las células y resuspender en medio RPMI conteniendo rhIL-2 y rhIL-4.
6. Incubar durante 3 días.
7. Recoger las células y reestimarlas durante 4 horas con una de las combinaciones de activadores:
 - PMA 5 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
 - PMA 5 ng/mL + ionóforo A23187 250 ng/mLen presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
8. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.2 Inducción de TNF-β:

1. Recubrir la superficie de los pocillos con anticuerpo CD3 (10 µg/mL)
2. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
3. Añadir rhIL-2: 10 ng/mL
4. Incubar durante 2 días en estufa a 37°C y 5% CO₂ .
5. Lavar las células y resuspender en medio RPIMI conteniendo rhIL-2.
6. Incubar durante 3 días.
7. Recoger las células y reestimarlas durante 4 horas con una de las combinaciones de activadores:
 - PMA 5 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
 - PMA 5 ng/mL + ionóforo A23187 250 ng/mL
 - anticuerpo CD3 + anticuerpo CD28en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
8. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.3 Inducción de IL-2, TNF-α, IFN-γ:

1. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
2. Estimular las células durante 6 horas con una de las combinaciones de activadores:
 - PMA 50 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
 - PMA 50 ng/mL + ionóforo A23187 500 ng/mLen presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
3. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.4 Inducción de IL-1 α , IL-6, IL-8 y GRO- α :

1. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
2. Estimular las células durante 4 horas con LPS (1 μ g/mL) en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
3. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.5 Inducción de IL-10, MCP-1, MIP-1 α , MCP-3 y MIG:

1. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
2. Estimular las células durante 24 horas con LPS (1 μ g/mL) en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
3. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.6 Inducción de IL-12:

1. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
2. Pre-estimular las células durante 2 horas con rhIFN- γ (10 ng/mL)
3. Estimular las células con rhIFN- γ (10 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL) durante 22 horas en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas.
4. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

3.7 Inducción de RANTES:

1. Dispensar alícuotas de 10⁶ células (1 mL RPMI) en los pocillos determinados.
2. Cultivar las células (preferiblemente células T) durante 24 horas en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas (preferiblemente monensina o GolgiStop).
3. Proceder al marcaje de simultáneo de superficie/intracelular.

Sugerencias

1. Los parámetros críticos en el análisis citométrico de citocinas son el tipo celular y el protocolo de activación; la duración del período de incubación; la inclusión de un inhibidor del transporte de proteínas y la elección del anticuerpo anti-citocina.
2. La incubación con inhibidores del transporte de proteínas puede interferir con la expresión de marcadores de superficie (p.ej., la brefeldina disminuye la expresión en superficie de CD14)
3. La activación con PMA provoca una disminución transitoria de la expresión de CD4. La activación con PMA e ionóforos de calcio provoca una disminución más duradera e intensa.

ANALISIS CITOMETRICO DEI pH CITOSOLICO EN PLAQUETAS DE SANGRE ENTERA

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato
Tampón Hepes-Na⁺
BCECF AM (Molecular Probes): 1mM en DMSO
Anticuerpo monoclonal CD41-PE (Immunotech)
Modificadores del pH:
- Propionato
- CINH₄
- Nigericina
- EIPA
Baño termostatzado a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular un tubo de 12x75 mm por muestra. Dispensar 50 µl de sangre + 450 µl de tampón (dilución 1/10).
2. Añadir 2.5 µl de Fluo-3 AM a cada tubo.
3. Incubar 15 minutos a 37°C en semioscuridad.
4. Rotular 3 tubos por muestra.
5. Dispensar 15 µl de sangre diluida marcada con Fluo-3.
6. Añadir 5 µl de CD41-PE a cada tubo.
7. Dispensar 4 µl de GPRP sólo en el tubo de activación con trombina
7. Incubar a 37°C y en oscuridad durante 15 minutos.
8. Añadir a cada tubo 500 µl de tampón Tyrode a 37°C.
9. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente:
10. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
11. A los 15 segundos, detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el volumen del agonista correspondiente.
12. Colocar rápidamente el tubo en el citómetro y reanudar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado.

Sugerencias

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (hasta 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torniquete y desechando los primeros mililitros.
3. Para evitar el arrastre de plaquetas activadas entre dos análisis consecutivos, se recomienda intercalar tubos de sangre diluída entre muestras activadas, adquiriendo durante 15-30 segundos y abortando el análisis.

ANALISIS CITOMETRICO DEL pH INTRACELULAR EN LEUCOCITOS DE SANGRE ENTERA

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con EDTA
Tampón Hepes-Na⁺
BCECF- AM (Sigma): 1mM en DMSO
Anticuerpo monoclonal CD45-PC5 (Immunotech)
Modificadores del pHi:
- Propionato
- CINH4
- Nigericina
- EIPA
Inhibidor de la coagulación: GPRP
Baño termostatzado a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular un tubo de 12x75 mm por muestra. Dispensar 100 µl de sangre.
2. Añadir 5 µl de anticuerpo CD45-PC5 a cada tubo.
3. Incubar 10 minutos a T.A. en oscuridad.
4. Añadir 900 µl de tampón Hepes-Na⁺.
5. Dispensar 15 µl de sangre diluida marcada con Fluo-3.
6. Añadir 5 µl de CD41-PE a cada tubo.
7. Dispensar 4 µl de GPRP sólo en el tubo de activación con trombina
7. Incubar a 37°C y en oscuridad durante 15 minutos.
8. Añadir a cada tubo 500 µl de tampón Tyrode a 37°C.
9. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente:
10. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
11. A los 15 segundos, detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el volumen del agonista correspondiente.
12. Colocar rápidamente el tubo en el citómetro y reanudar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado.

Sugerencias

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (hasta 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torniquete y desechando los primeros mililitros.
3. Para evitar el arrastre de plaquetas activadas entre dos análisis consecutivos, se recomienda intercalar tubos de sangre diluida entre muestras activadas, adquiriendo durante 15-30 segundos y abortando el análisis.

