

OPTIMIZACIÓN DE VOLTAJES Y CONTROL DE LA DISPERSIÓN: DETALLES QUE MARCAN LA DIFERENCIA.

Beatriz Álvarez Flores. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid

Los avances tecnológicos de la citometría de flujo están permitiendo en la actualidad que se puedan incorporar muchos más fluorocromos en los experimentos debido a la incorporación en el mercado de equipos con más láseres y más detectores. Esto posibilita realizar paneles con muchas fluorescencias en cada tubo y, por tanto, un fenotipaje muy completo de las diferentes poblaciones. Lamentablemente, esto conlleva a su vez, cierto incremento en la complejidad a la hora de diseñar los paneles, ya que son muchos los aspectos que pueden influir en la correcta resolución de poblaciones con expresiones antigénicas débiles de aquellas que son negativas. Los factores que interfieren en una correcta resolución pueden tener su origen en la propia muestra (autofluorescencia, rotura de los tándems, solapamiento de espectros...) o del citómetro de flujo (potencia de los láseres, deficiencias ópticas, voltajes subóptimos...). Por ello es conveniente considerar un correcto ajuste de los voltajes que permitan trabajar con un coeficiente de variación (CV) bajo que nos permitirá una mayor discriminación de las poblaciones. Para ello se pueden considerar las curvas de CVs de los parámetros vs los diferentes voltajes o bien el índice de tinción vs voltaje. Cabe destacar que una vez alcanzado el punto en el que se aplanan las curvas no se encontraría mejoría en utilizar voltajes mayores. Por otro lado, otro factor de alto impacto en la resolución de las poblaciones es el llamado "error de dispersión", causado por un error del detector cuando recibe numerosos fotones de distintas procedencias siendo mayor, cuanto mayor es el número de fluorocromos con los que trabajamos. Este error se puede solventar o reducir modificando los paneles y/o en algunos casos reduciendo la concentración de anticuerpo conjugado (ya que en numerosas ocasiones trabajamos con concentraciones muy elevadas). Además, el uso de matrices de dispersión puede ayudar a la identificación de los fluorocromos que más interfieren entre sí en nuestro citómetro y bajo nuestras propias condiciones. El conocimiento de estos aspectos se traducirá en un mejor diseño de nuestros paneles, así como de la configuración de nuestro citómetro que redundará finalmente, en la generación de datos de gran calidad.