

PRESCRIPCIONES TÉCNICAS DEL SUMINISTRO DE UN CITÓMETRO DE FLUJO BASADO EN TECNOLOGÍA MICROCAPILAR PARA EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

La citometría de flujo es una técnica de análisis que permite analizar de forma rápida propiedades de células o partículas en suspensión. Las células o partículas son expuestas individualmente en un flujo de muestra a una luz láser de longitud de onda conocida. Se adquieren parámetros tales como el número y la concentración de células o partículas y la fluorescencia emitida por sondas fluorescentes al ser excitadas por un láser.

Los datos obtenidos lo son de células o partículas individuales. La cantidad de eventos analizados individualmente es muy alta (miles de células o partículas) por lo que se obtienen datos de un alta fiabilidad estadística. Además la detección es multiparamétrica con lo que se obtiene un importante volumen de información. Todo esto convierte a la citometría de flujo en una técnica imprescindible en biología celular.

Habitualmente los citómetros han estado restringidos a laboratorios centralizados de servicios. Sin embargo en los últimos años han aparecido citómetros basados en microcapilares que por su mantenimiento sencillo y económico, facilidad de uso, pequeño tamaño y precio son adecuados para su instalación en un departamento. Esto facilita el trabajo con células vivas o con marcajes inestables y permite su uso como uno más de los equipos disponibles en el Departamento.

El citómetro adquirido debe ser sencillo y económico en cuanto a su mantenimiento para no requerir fondos o personal específico. Los reactivos y muestras a utilizar deben ser mínimos: sin líquido de flujo, mínimo volumen muerto, etc. El mantenimiento no debería requerir sustituir piezas o tubos en el interior del equipo.

Una de las aplicaciones básicas del citómetro será el contaje de células, por lo que debe proporcionar recuento absoluto sin necesidad de beads de referencia. Por ello se excluyen los que utilizan bombas peristálticas, que necesitan sustituir periódicamente los tubos para mantener la volumetría.

Con el fin de cubrir las necesidades básicas se propone la adquisición de un citómetro con especificaciones básicas pero de calidad y con capacidad de ampliación. Por tanto que disponga de un solo láser azul que al menos tenga 50 mW de potencia y con capacidad para adquirir en cada evento tamaño (FSC), complejidad (SSC) y con tres fotomultiplicadores para adquirir fluorescencias de tres longitudes de onda (colores) diferentes. Para aplicaciones futuras debe ser posible ampliarlo hasta adquirir más de 10 colores y tres láseres, especialmente verde (532 nm) para el uso de proteínas fluorescentes (como DsRED, dTomato y mCherry) y violeta (405 nm) para la utilización de fluorocromos tipo Brilliant Violet y Quantum Dot.

Puesto que se pretende que cumpla con diversas necesidades del Departamento en cuanto a citometría de flujo, debe tener un rango dinámico adecuado para múltiples tipos de muestra por lo que debe ser capaz de trabajar con células de más de 60 micrómetros y con velocidades de flujo de menos de 10 microlitros/minuto para maximizar la sensibilidad de partículas de pequeño tamaño.

La elevada cantidad de datos que adquiere un citómetro hace que el software sea un elemento fundamental para el buen funcionamiento. El software debe permitir el uso del citómetro con ensayos y reactivos de cualquier tipo. Pero para reducir el tiempo invertido en la formación de

nuevos usuarios debe disponerse de reactivos y software diseñados para funcionar en conjunto y producir datos de calidad en las aplicaciones más comunes (viabilidad, apoptosis, ciclo celular, citotoxicidad). Para la utilización del citómetro en ensayos farmacológicos el software debe ser capaz de calcular curvas dosis-respuesta y valores de EC50/IC50 así como mostrar heatmaps (representación gráfica de datos en una matriz de intensidades de color). Junto con el citómetro se necesitará un ordenador tipo dedicado al mismo. Un ordenador portátil permite ahorrar espacio y dispone de una batería que evita la pérdida de datos en caso de corte de suministro.

El citómetro debe ser instalado en el laboratorio por un técnico especializado de la empresa fabricante, que dispondrá de servicio técnico de reparaciones en Madrid. Además debe suministrarse formación in situ por personal de la empresa fabricante especializado en aplicaciones de citometría.

Características de Citómetro cuya adquisición se solicita. Citómetro digital de sobremesa con célula de flujo microcapilar sin necesidad de agua, "Sheath Fluid" o cualquier tipo de líquido de flujo:

- Láser único con emisión a 488 nm de al menos 50 mW. Actualizable hasta tres láseres, incluyendo láseres verde, rojo y violeta.
- Parámetros no derivados adquiridos: FSC (forward scatter), SSC (side scatter), tiempo y fotomultiplicadores para tres fluorescencias (verde, amarillo y rojo). Actualizable hasta más de 10 fluorescencias.
- Mínimo mantenimiento: No debe requerir alineamientos del láser, célula de flujo reemplazable por el usuario sin abrir la carcasa. Posibilidad de efectuar contralavados de la célula de flujo.
- Debe generar no más de 50 ml de residuos en un día completo de trabajo.
- Cargador para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Capacidad de conteo absoluto de células sin necesidad de beads de referencia, sustitución periódica de tubos o carga de volúmenes determinados.
- Menos de 500 nL de volumen muerto entre el tubo de muestra y el láser.
- Velocidad de flujo variable, incluyendo menos de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$.
- Aspiración de la muestra mediante bomba de pistón/jeringa de alta precisión, sin bombas peristálticas.

Ordenador portátil con batería que permita su funcionamiento en caso de corte de corriente. Debe incluir un software abierto y la disponibilidad de módulos de software y reactivos específicos para viabilidad, apoptosis, ciclo celular, citotoxicidad, etc. También incluiría heatmaps, cálculo de curvas dosis-respuesta y valores de EC50/IC50.

Madrid, 31 de mayo de 2017

Directora del Departamento de Farmacología




Fdo.: Juana Benedí González
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA