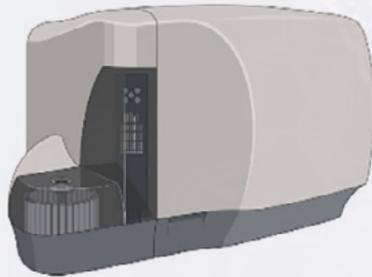


CAPÍTULO 12

CITOMETRÍA DE FLUJO



Día 1. Siembra celular

1. Sembrar las células en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*) o de 24 pocillos (*3524, Corning*).

Día 2. Tratamientos

2. Tratar las células según corresponda en tiempo y concentración.

Día de marcaje y análisis

3. Recuperar las células con tripsina y se añaden junto a las que se encuentran en suspensión a tubos de citometría (1 por pocillo), posteriormente se centrifugan a 1.230 xg durante 5 min y se elimina el sobrenadante.
4. Según el análisis que queremos realizar, resuspender el pellet en diferentes tampones [3, 14].

Anexina V-FITC (*ANXVF-200T, Immunostep*) para detectar la fosfatidilserina de la membrana interna celular, que queda expuesto en la cara externa en etapas tempranas del proceso apoptótico: Añadir 200 μL /pocillo diluida en una solución de tampón anexina V en PBS 1X. Incubar 15 minutos a 37 °C o 30 min a T^a ambiente. La fluorescencia verde emitida se capta en el canal FL1.

Yoduro de propidio (IP) (*P4170, Sigma*), para determinar el porcentaje de muerte celular: Añadir a cada uno de los tubos 10 μL de IP 1 $\mu\text{g/ml}$ (previamente incubados con anexina V-FITC). La fluorescencia emitida se determinó analizando la población celular en el canal FL3.

DIOC₆(3) (3,3-dihexiloxacarbocianina yodado) (*D273, Invitrogen*) es un fluorocromo lipofílico catiónico que se retiene en la parte cargada negativamente de la membrana de las mitocondrias con un potencial de membrana normal. Incubar las células durante 15 min a 37 °C con DIOC₆(3) diluido en medio celular a una concentración final de 40 nM.

Hidroetidio (He) (*D399, Invitrogen*) para detectar la generación de radical superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana de la mitocondria. Incubar las células durante 15 min a 37 °C con He diluido en PBS 1X a una concentración final de 5 μM . El He citosólico muestra fluorescencia azul, pero cuando es oxidado a etidio emite fluorescencia roja. La fluorescencia emitida se analizó en el canal FL3.

Diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoreceína (H₂DCFDA) (*10533084, Invitrogen*) para determinar la generación de ROS. Incubar las células durante 15 min a 37 °C diluido en PBS 1X a una concentración final de 1 μM . La membrana plasmática es permeable a este fluorocromo, que en el interior de la célula es convertido a diclorodihidrofluoreceína (H₂DCF) por las esterasas intracelulares. Cuando se pone en contacto con ROS, emite fluorescencia verde que será detectada en el canal FL1.

