

EL CITÓMETRO DE FLUJO

Borja Barrera Cuesta

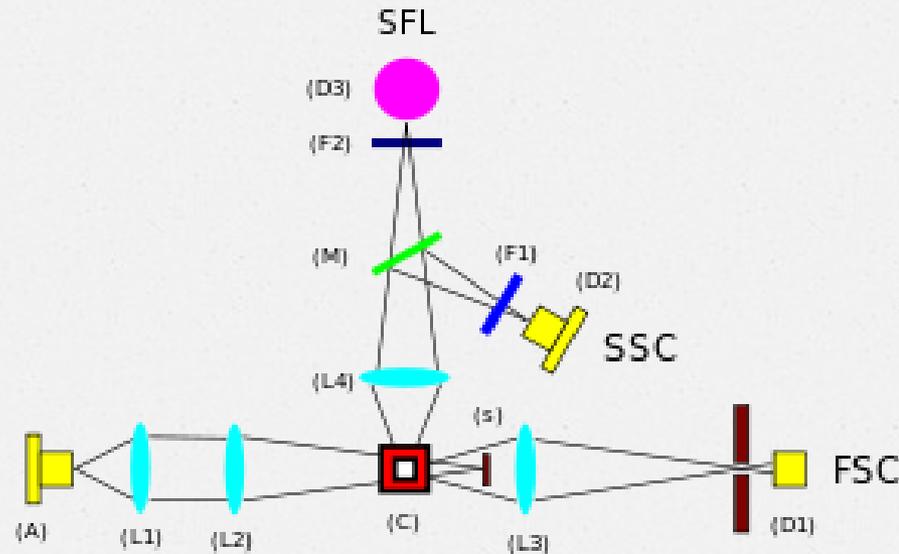


¿Qué es la citometría de flujo?

- Se trata de una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz.
- Las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido.
- Las células pueden hacerse pasar a muy altas velocidades (pueden llegar a alcanzarse velocidades cercanas a las 100.000 células por segundo).

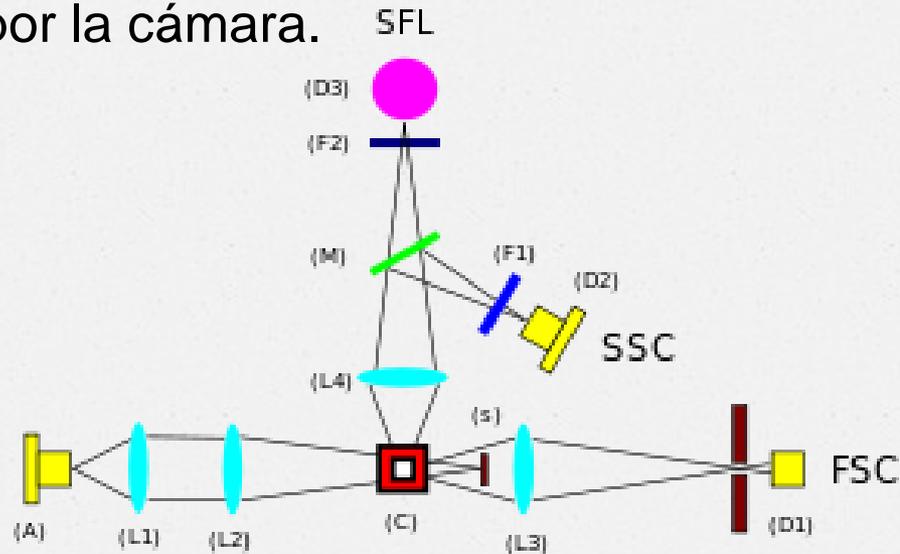
¿En qué consiste?

- Uno o varios rayos de luz monocromáticos, usualmente de luz láser, son dirigidos hacia un finísimo chorro de líquido en el que están suspendidas las células y pasan de una en una en fila. Al atravesar el rayo de luz, las células interactúan con este causando dispersión de la luz.



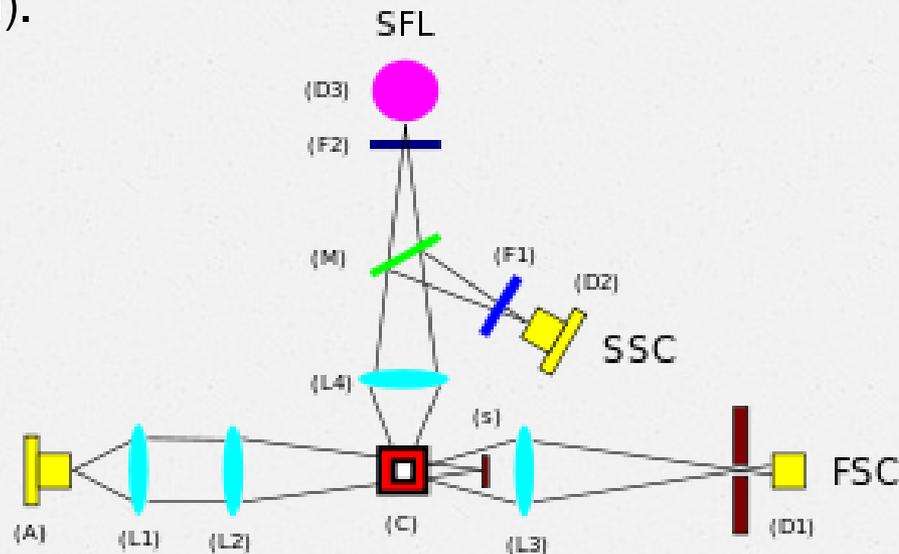
¿En qué consiste?

- Se colocan además una serie de detectores.
- Uno se coloca en línea con el rayo de luz (a este detector se lo conoce como FSC, por *Forward Scatter* o detector de Dispersión Frontal).
- Con él se puede evaluar el tamaño y volúmen de las células que pasan por la cámara.



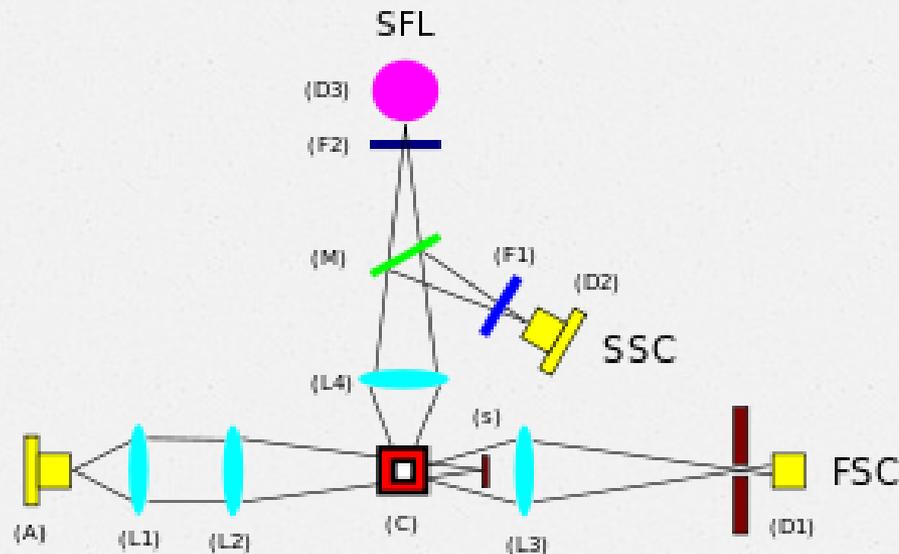
¿En qué consiste?

- Otro se coloca angularmente a la trayectoria del rayo (a este se le conoce como SSC, por *Side Scatter*, o detector de Dispersión Lateral).
- Este detector nos da información acerca de la complejidad interna de las células (por ejemplo la forma del núcleo, la cantidad y tipo de gránulos citoplasmáticos o la rugosidad de la membrana).

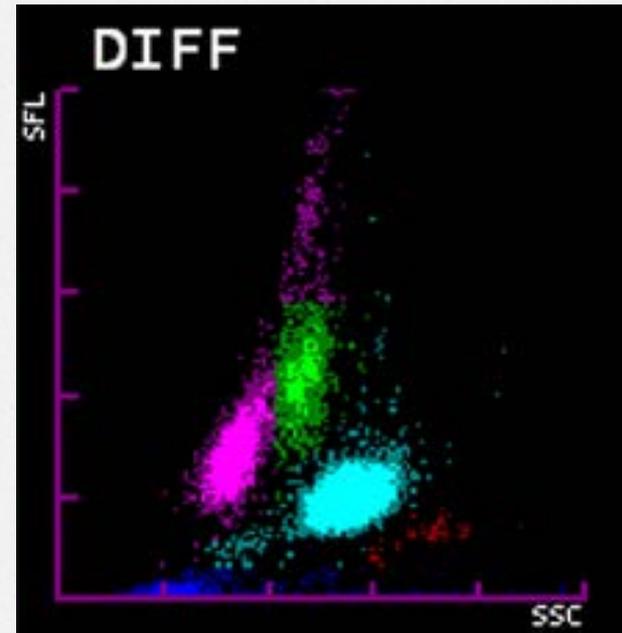
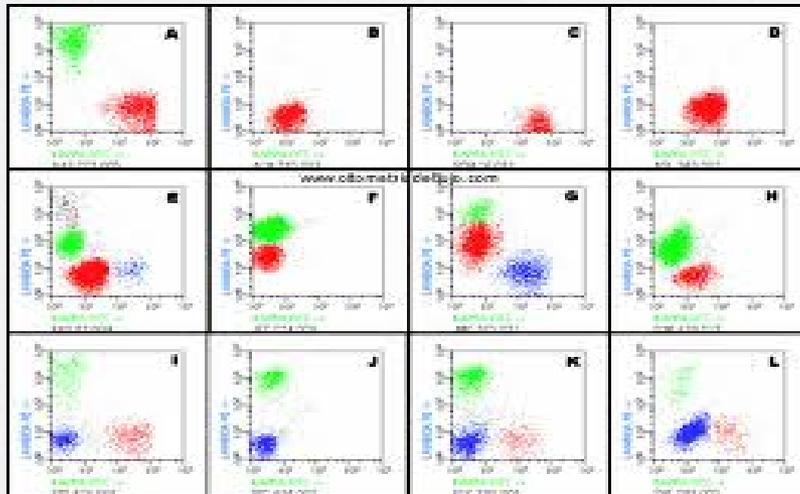


¿En qué consiste?

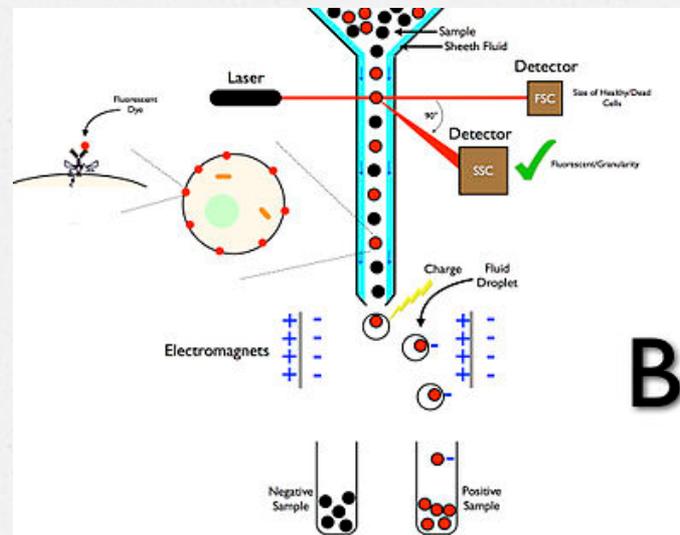
- Además se colocan uno o varios detectores de fluorescencia que podremos programar para detectar distintas longitudes de onda en función de lo que nos interese.



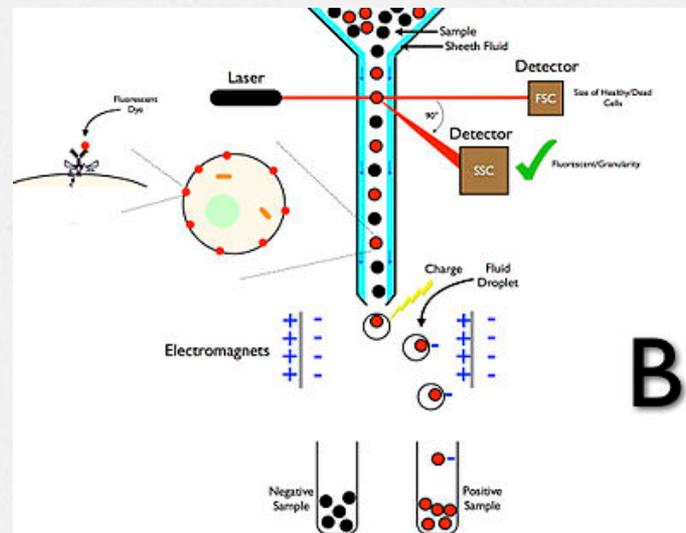
- Todos estos datos son interpretados y procesados por el programa y podremos seleccionar las células que nos interesen dentro de un cultivo de diferentes células en suspensión.



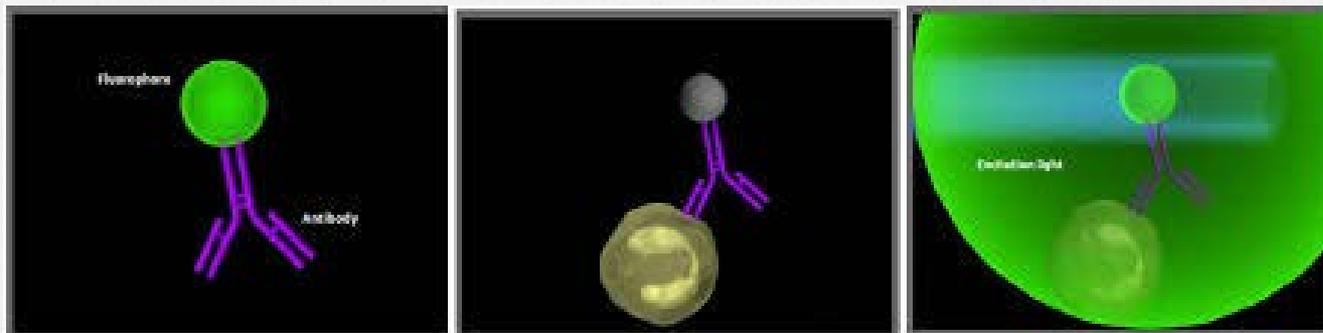
- Tipo especializado de citometría de flujo: citómetros FACS, por sus siglas en inglés (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*).
- Esta técnica provee un método para la clasificación y selección de células provenientes de una mezcla de varias poblaciones, según las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula.



- Técnica de gran utilidad ya que analiza datos provenientes de cada célula y es rápido, objetivo y cuantitativo, permitiendo la separación física de aquellas células pertenecientes a una población de interés.



- Si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con **moléculas fluorescentes**, se puede evaluar qué células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados.



Tipos de marcadores

- Se pueden utilizar un amplio rango de fluoróforos como etiquetas para el marcado fluorescente en citometría de flujo.
- Los fluoróforos se encuentran por lo general químicamente unidos a anticuerpos específicos capaces de reconocer una determinada molécula diana en la superficie o en el interior de la célula.
- Estas etiquetas fluorescentes también pueden adosarse químicamente a casi cualquier compuesto químico que presente una cierta afinidad por la membrana o alguna otra estructura celular.

Tipos de marcadores

- Cada fluoróforo posee un pico de excitación característico, y un longitud de onda de emisión también característica.
- Los espectros de emisión de diferentes marcadores con frecuencia se superponen.
- La combinación de marcadores que pueden ser usados depende de la longitud de onda del láser(es) usados para excitar los fluorocromos y de los tipos de detectores que se encuentren disponibles

Tipos de marcadores

- o **Marcadores fluorescentes de unión covalente:** Isoticianato de fluoresceína, picroeritrina, rodamina, rojo texas, cianinas...
- o **Marcadores fluorescentes de unión no covalente:** Hoechst, DAPI, Naranja de acridina, yoduro de propidio, rh12.

APLICACIONES

- Volumen y complejidad morfológica de las células
- Pigmentos biológicos (clorofila, ficoeritrina)
- Contenido total de ADN (análisis del ciclo celular....)
- Expresión y localización de proteínas
- Antígenos celulares de superficie (marcadores CD)
- Antígenos intracelulares (Citoquinas)
- Actividad enzimática
- Fluidez de membrana
- Apoptosis
-

APLICACIONES

- Esta tecnología tiene aplicaciones en un gran número de campos, incluyendo la biología molecular, la patología, la inmunología, la biología vegetal y la biología marina.
- Especialmente útil en el campo de la biología molecular cuando se usan anticuerpos etiquetados fluorescentemente.
- Estos anticuerpos específicos se unen a antígenos de las células diana y ayudan a dar información de las características específicas de las células rebuscadas en el citómetro.
- Tiene grandes aplicaciones en medicina (especialmente en trasplantes, hematología, inmunología de tumores y quimioterapia, genética y selección de esperma).



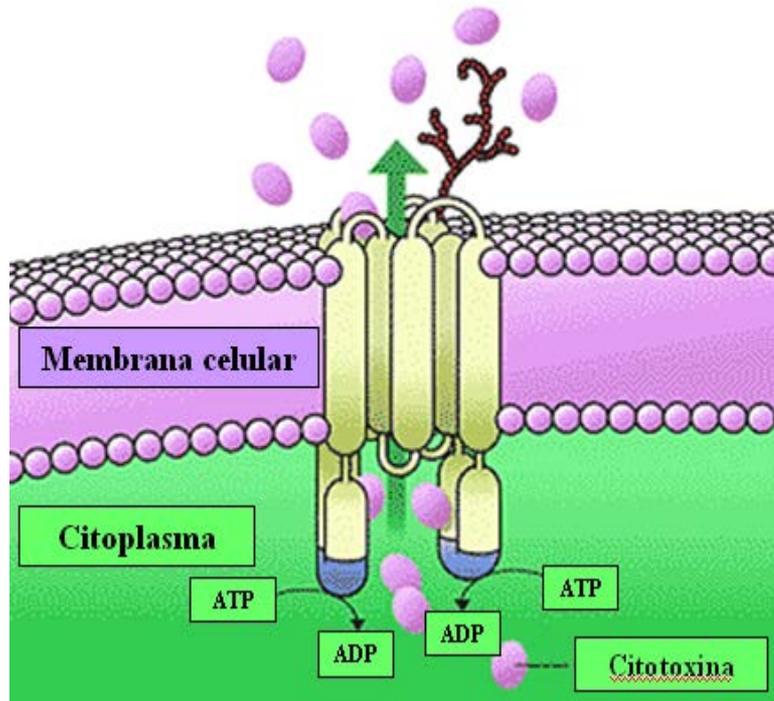
EXPERIMENTO DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE FÁRMACOS



INTRODUCCIÓN

Transportador ABCG2

ATP-Binding Cassette

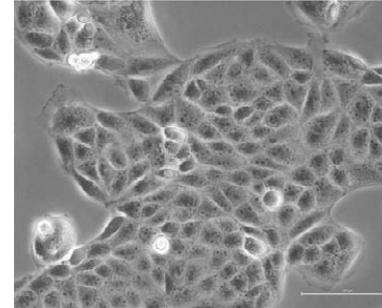


- ✓ Bombas exportadoras, transporte activo
- ✓ Amplia distribución y estructura muy conservada
- ✓ Amplia variedad de sustratos
- ✓ Expresión en órganos relacionados con la farmacocinética de compuestos: alteración de la biodisponibilidad de sus sustratos

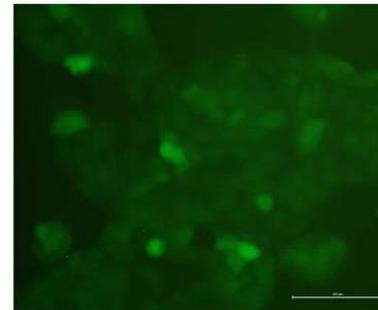
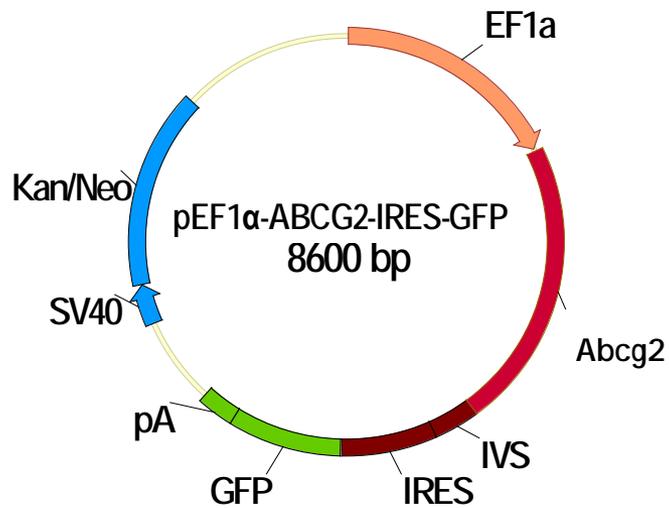


Utilizamos células MDCKII:

- Línea parental sin ABCG2.



- Líneas transducidas con Abcg2 de ratón

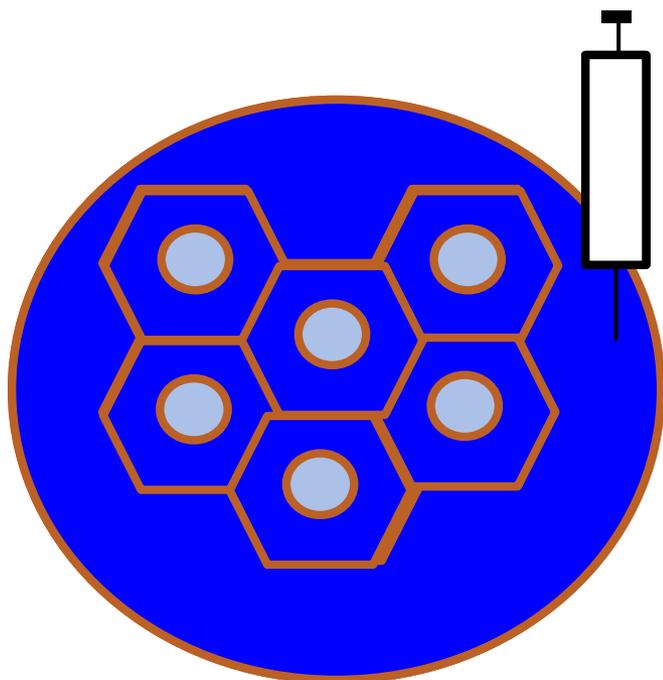




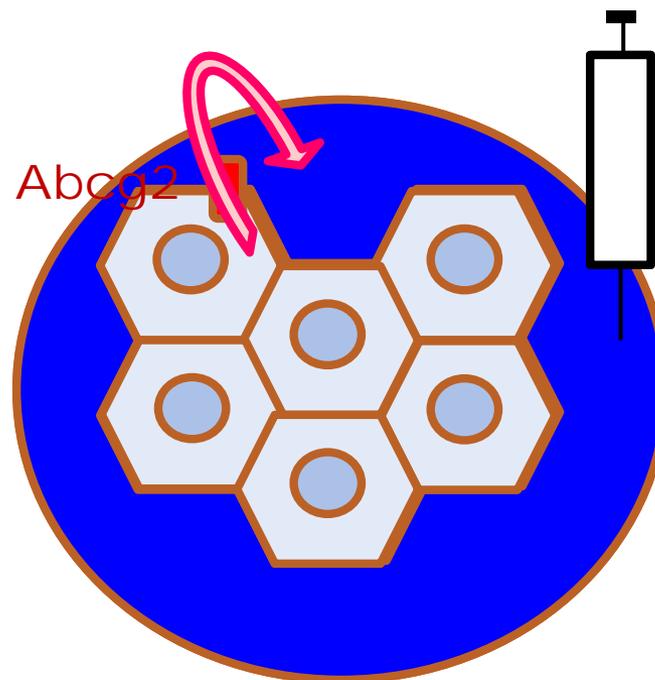
MATERIAL Y MÉTODOS OBJETIVO I

Experimentos de acumulación intracelular de MXR

- Mitoxantrona = Sustrato fluorescente
- Medida de la acumulación intracelular de mitoxantrona mediante citometría de flujo



CÉLULAS PARENTALES

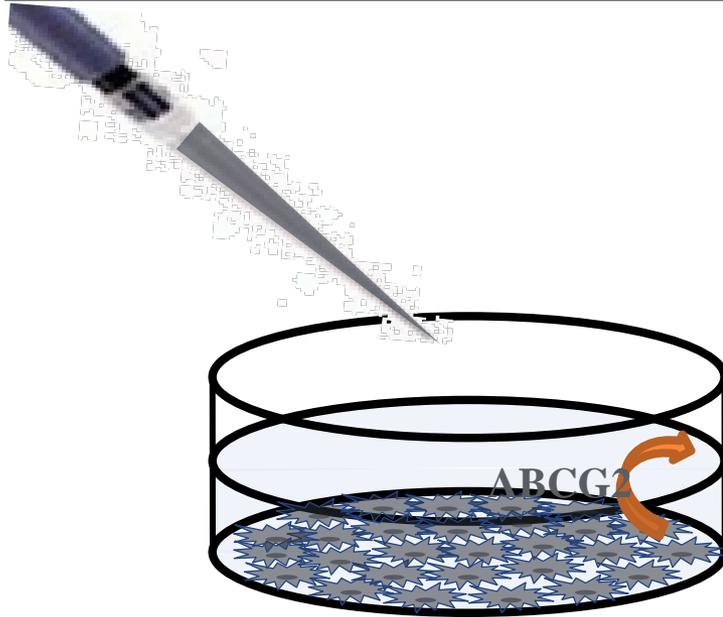


CÉLULAS CON Abcg2



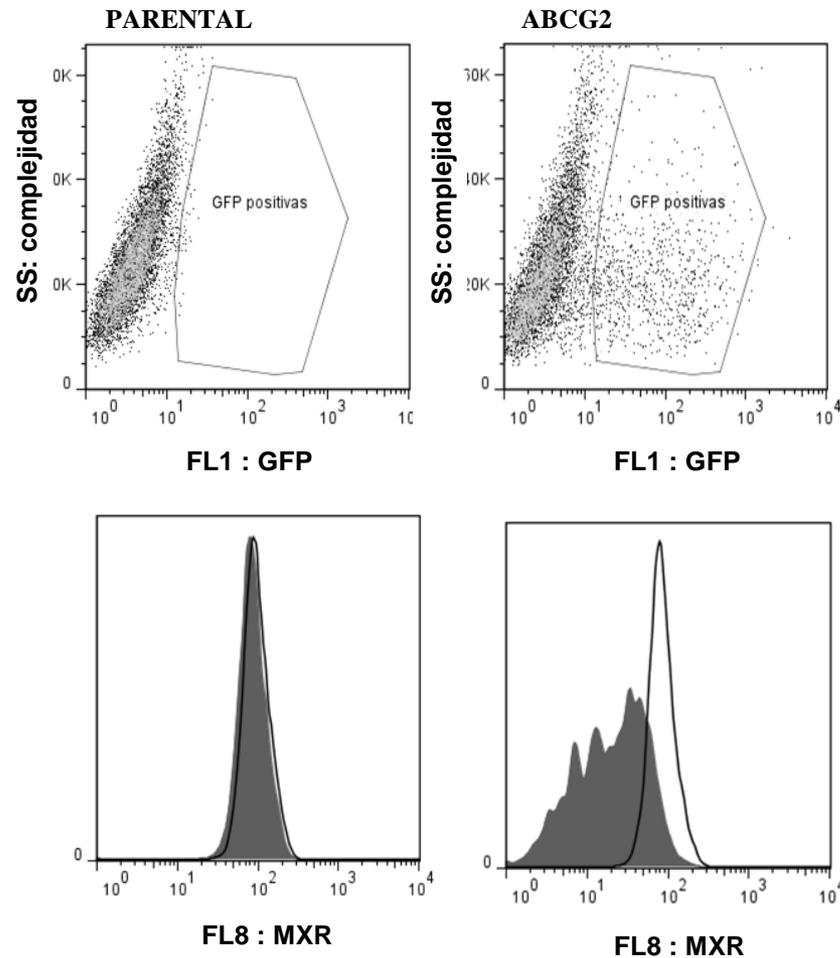
MATERIAL Y MÉTODOS OBJETIVO I

Experimentos de acumulación intracelular de MXR



Ko143: Inhibidor específico de ABCG2

MF: Mediana de fluorescencia

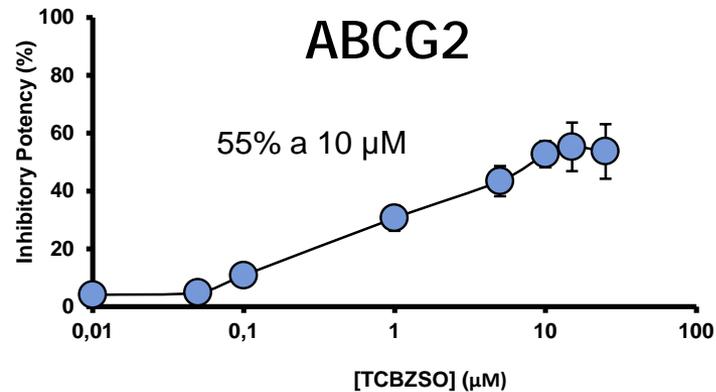
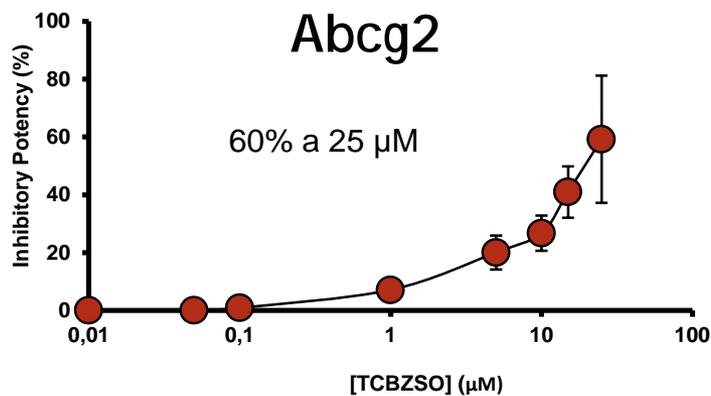
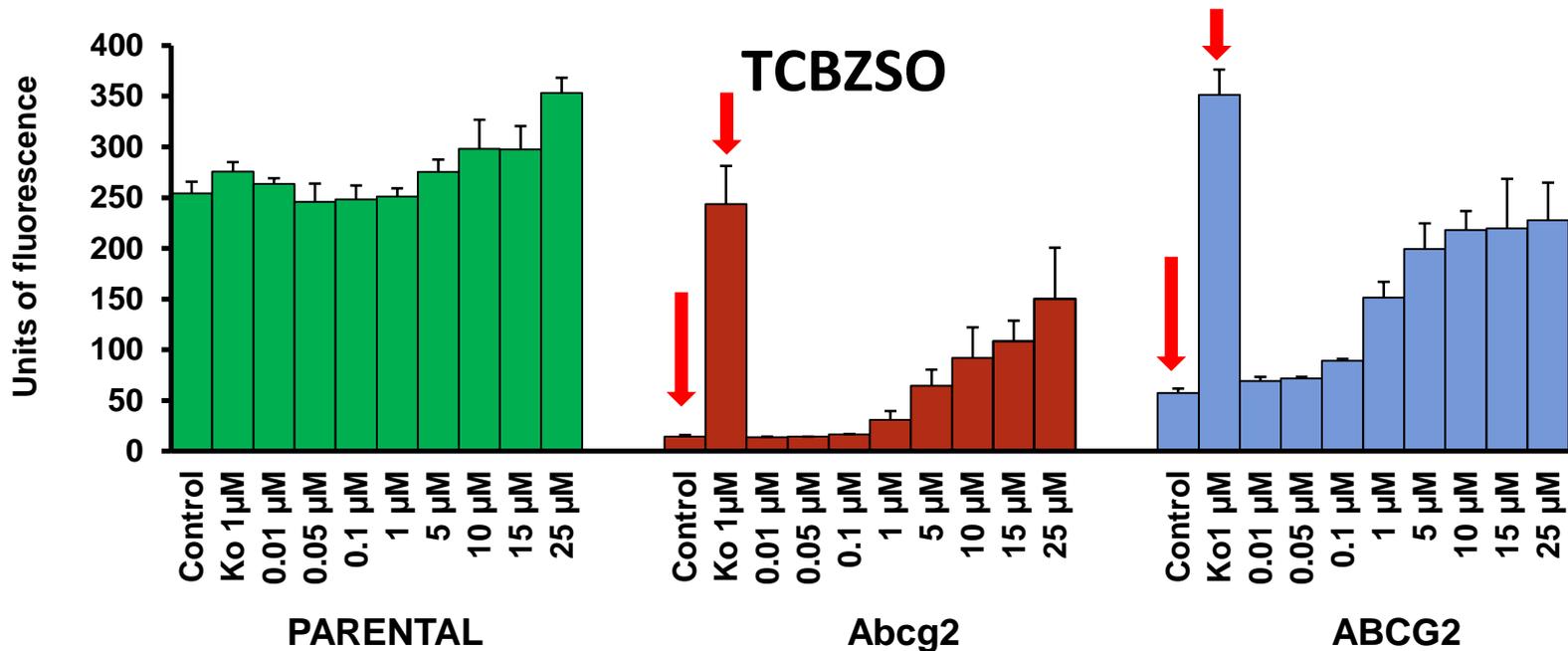


$$\text{Potencia inhibitoria (\%)} = \frac{\text{MF con inhibidor} - \text{MF sin inhibidor}}{\text{MF con Ko143} - \text{MF sin inhibidor}} \times 100$$



RESULTADOS OBJETIVO I

Acumulación intracelular de mitoxantrona en ratón y humana

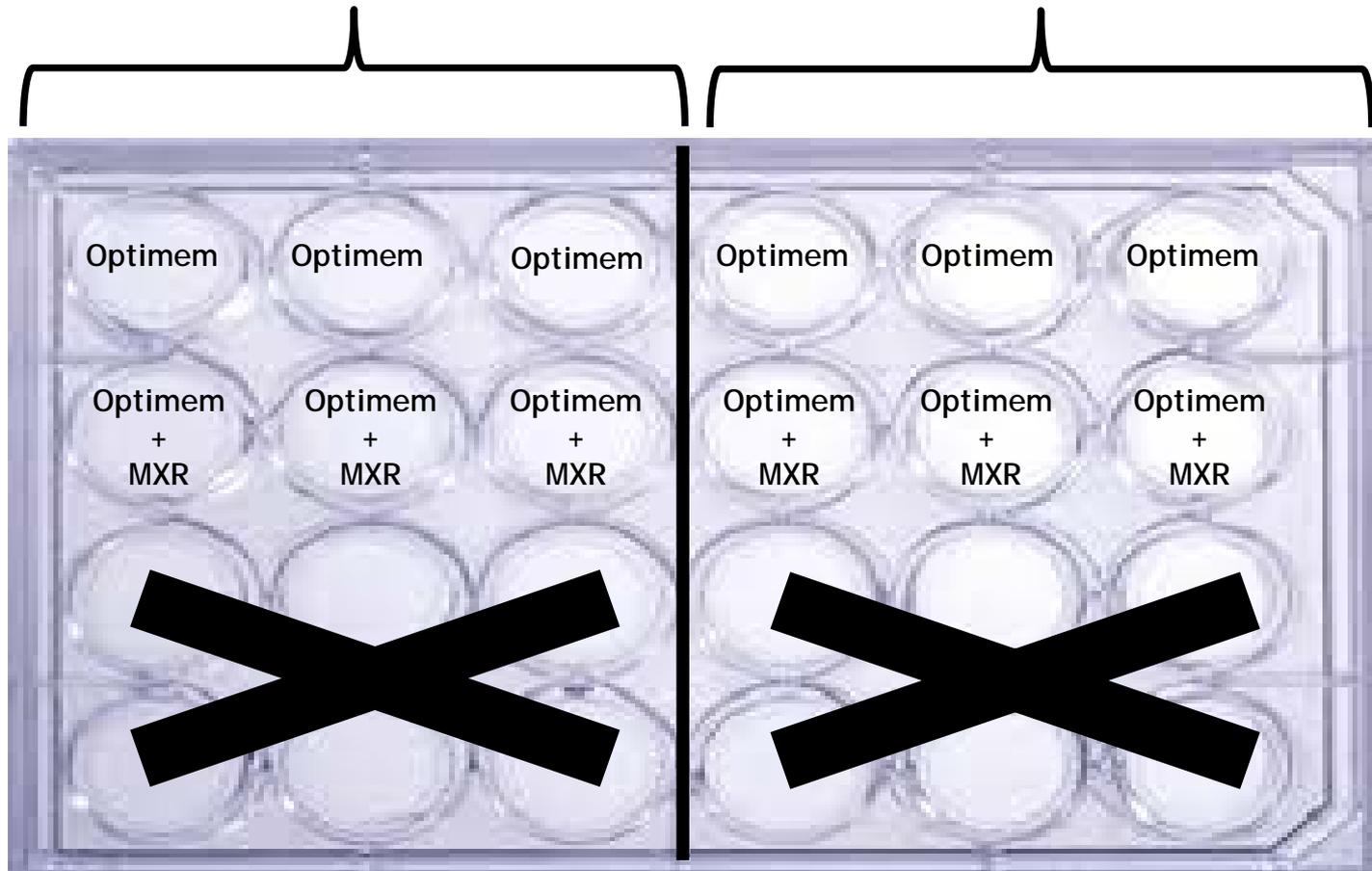


PLACA DE 24 POCILLOS

MXR = mitoxantrona

PARENTALES

Abcg2 de RATÓN





**MUCHAS
GRACIAS
POR SU
ATENCIÓN**