

***OBSERVACION MORFOLOGICA DE APOPTOSIS
POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA
EN CELULAS FRESCAS***

1. Material:

Solución de tinción de cromatina (Hoechst 33348: 1 mg/ml en DMSO)
Solución de contraste de células necróticas (yoduro de propidio: 1 mg/ml en PBS)
Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo
PBS
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Centrífuga o citocentrífuga (Cytospin)
Portaobjetos y cubreobjetos
Microscopio de fluorescencia

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión de células individuales, como se describe en los procedimientos anteriores.
2. Resuspender en 1ml de medio de cultivo o PBS.
3. Añadir 5 μ l de solución de tinción de cromatina y 5 μ l de solución de contraste de células necróticas
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
5. Centrifugar y lavar con PBS.
6. Decantar el sobrenadante y realizar una extensión del botón celular sobre un portaobjetos.
7. Si se dispone de citocentrífuga, obtener un citospin de la preparación.
8. Observar al microscopio de fluorescencia utilizando excitación UV.

Sugerencias

1. La observación prolongada al microscopio de células frescas bajo cubreobjetos puede inducir fenómenos de necrosis celular.
2. Para obtener fotografías con mejor contraste de células teñidas con Hoechst 3348 y yoduro de propidio es mejor utilizar la doble exposición (luz UV y verde).
3. La óptica de contraste de fase permite observar los fenómenos de modificación de membrana plasmática que acompañan a la apoptosis.

***OBSERVACION MORFOLOGICA DE APOPTOSIS
POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA
EN CELULAS FIJADAS***

1. Material:

Solución de tinción de cromatina (Hoechst 33348: 1 mg/ml en DMSO)
Solución de contraste citoplásmico (Sulforhodamina 101: 1 mg/ml en DMSO)
Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo
Etanol 70% (mantenido a -20°C)
PBS
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Centrífuga o citocentrífuga (Cytospin)
Portaobjetos y cubreobjetos
Microscopio de fluorescencia

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión de células individuales, como se describe en los procedimientos anteriores.
2. Fijar las células con etanol 70%, como se indica en procedimientos anteriores.
3. Incubar las células fijadas al menos 1 hora a -20°C o conservar a -20°C hasta su análisis.
4. Lavar la suspensión de células fijadas y resuspender en 1ml de medio de cultivo o PBS.
5. Añadir 5 μl de solución de tinción de cromatina y 5 μl de solución de contraste citoplásmico.
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
7. Centrifugar y lavar con PBS.
8. Decantar el sobrenadante y realizar una extensión del botón celular sobre un portaobjetos.
9. Si se dispone de citocentrífuga, obtener un citospin de la preparación.
10. Observar al microscopio de fluorescencia utilizando excitación UV.

Sugerencias

1. La utilización de células fijadas con etanol permite conservar las muestras durante mayor tiempo hasta su observación.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA PERMEABILIDAD PARCIAL AL YODURO DE PROPIDIO

1. Material:

Solución de yoduro de propidio: 1 mg/ml en PBS

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

PBS

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener suspensiones de células individuales a partir de cultivos celulares en monocapa o en suspensión.
2. Resuspender las células en 1 ml de medio de cultivo o PBS (10^5 - 10^6 células/ml).
3. Añadir 5 μ l de solución de yoduro de propidio.
4. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. El análisis monoparamétrico de la fluorescencia de yoduro de propidio puede incluir entre la población de permeabilidad parcial al propidio cuerpos apoptóticos con necrosis secundaria. Para cuantificar con precisión las células apoptóticas es mejor realizar un análisis biparamétrico de fluorescencia de propidio frente a dispersión frontal de luz.
2. La incubación prolongada de las muestras antes de su análisis puede incrementar el porcentaje de células apoptóticas o necróticas, sobre todo si están resuspendidas en PBS en lugar de en medio de cultivo.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DE RESIDUOS DE FOSFATIDILSERINA EN LA MEMBRANA PLASMATICA

1. Material:

Annexin V FITC Kit (Immunotech):

- Anexina V humana recombinante, conjugada con FITC
- Yoduro de propidio (250 µg)
- Tampón de unión concentrado (Binding Buffer 10x)

Agua bidestilada

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

PBS

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener suspensiones de células individuales por los procedimientos específicos descritos anteriormente.
2. Diluir 1:10 el tampón de unión con agua bidestilada y mantener en baño de hielo.
3. Disolver 250 µg de yoduro de propidio en 1 ml de tampón de unión diluido.
4. Lavar la suspensión celular en medio de cultivo o PBS frío.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en tampón de unión diluido a una concentración de 10^5 - 10^6 células/ml. Mantener los tubos en hielo.
6. Dispensar en tubo de propileno 490 µl de suspensión celular y añadir 5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de solución de yoduro de propidio.
7. Incubar a 4°C y en oscuridad durante 10 minutos.
8. Analizar inmediatamente por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Preparar cada día la cantidad aproximada de tampón de unión diluido que se precise. Si se utiliza un kit con anexina concentrada (Immunotech IM 2376), preparar cada día la cantidad de anexina diluida (1:10 en tampón de unión diluido) que se precise. Conservar las soluciones stock concentradas.
2. La apoptosis es un fenómeno que puede proseguir durante la incubación con anexina. Procurar analizar inmediatamente las muestras teñidas.
3. El tampón de unión contiene calcio que puede acelerar la lesión de la membrana e inducir la necrosis en células funcionalmente comprometidas.
4. El uso de yoduro de propidio para discriminar células apoptóticas y necróticas requiere una correcta compensación de fluorescencia entre FITC y PI.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA APOPTOSIS CON ANEXINA V-FITC EN LEUCOCITOS AISLADOS DE SANGRE PERIFERICA

1. Material:

Annexin V FITC Kit (Immunotech):

- Anexina V humana recombinante, conjugada con FITC
- Yoduro de propidio (250 μ g)
- Tampón de unión concentrado (Binding Buffer 10x)

Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)

Agua bidestilada

Tubos eppendorf de 1.5 ml

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Baño de hielo

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Diluir 1:10 el tampón de unión con agua bidestilada y mantener en hielo.
2. Disolver 250 μ g de yoduro de propidio en 1 ml de tampón de unión diluido.
3. Dispensar 1 ml de Ficoll (mantenido a temperatura ambiente) en un tubo eppendorf de 1.5 ml colocado verticalmente sobre una gradilla estable
4. Dispensar cuidadosamente 500 μ l de sangre entera anticoagulada, evitando que se mezcle con el ficoll.
4. Dejar reposar durante 20-30 minutos el tubo abierto para que los eritrocitos se agreguen en presencia del ficoll y precipiten a gravedad normal.
5. Cuando hayan precipitado los eritrocitos, aspirar cuidadosamente 100-200 μ l de la parte superficial de la capa superior. Mantener en hielo hasta su uso.
6. Dispensar en un tubo de propileno 400 μ l de tampón de unión diluido y 100 μ l de suspensión celular.
7. Añadir 5 μ l de anexina V-FITC y 5 μ l de solución de yoduro de propidio.
8. Incubar a 4°C y en oscuridad durante 10 minutos.
9. Analizar inmediatamente por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Preparar cada día la cantidad aproximada de tampón de unión diluido que se precise. Si se utiliza un kit con anexina concentrada (Immunotech IM 2376), preparar cada día la cantidad de anexina diluida (1:10 en tampón de unión diluido) que se precise. Conservar las soluciones stock concentradas.
2. La apoptosis es un fenómeno que puede proseguir durante la incubación con anexina. Procurar analizar inmediatamente las muestras teñidas.
3. El tampón de unión contiene calcio que puede acelerar la lesión de la membrana e inducir la necrosis en células funcionalmente comprometidas.
4. El uso de yoduro de propidio para discriminar células apoptóticas y necróticas requiere una correcta compensación de fluorescencia entre FITC y PI.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA PRESENCIA DE POBLACIONES CON DNA SUBDIPLOIDE

1. Material:

Reactivo DNA-Prep Stain (Beckman-Coulter)
Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo
Etanol 70% (Conservado a -20°C)
PBS
Baño termostatzado a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Hemocitómetro
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión de células individuales, como se describe en los procedimientos anteriores.
2. Fijar las células con etanol 70%, como se indica en procedimientos anteriores.
3. Incubar las células fijadas al menos 1 hora a -20°C o conservar a -20°C hasta su análisis.
4. Lavar la suspensión de células fijadas y resuspender en 1ml de PBS.
5. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Centrifugar y resuspender el botón celular en 1 ml de reactivo DNA-Prep Stain.
7. Incubar durante 30 minutos a 37°C o durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. La utilización de soluciones concentradas de yoduro de propidio complica los procedimientos de compensación de fluorescencia, especialmente cuando el marcaje inmunofenotípico es débil.
2. La incubación de las muestras a 4°C durante toda la noche mejora la calidad de la tinción.
3. Se puede acelerar la velocidad de análisis de la muestra centrifugando la suspensión de células teñidas y eliminando parte del sobrenadante.
4. Analizar siempre utilizando una baja velocidad de flujo en el citómetro.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA INCORPORACION DE NUCLEOTIDOS FLUORESCENTES A LAS ROTURAS EN EL DNA

1. Material:

MEBSTAIN Apoptosis kit Direct (Immunotech):

- Tampón TdT (TdT buffer)
- desoxinucleótido conjugado (FITC-dUTP)
- desoxinucleótido transferasa terminal (TdT)

PBS

PBS-BSA 0.2%

Paraformaldehído tamponado (4% en $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0.1M pH 7.4)

Etanol 70% (mantener a -20°C)

Solución de contraste de yoduro de propidio (1 mg/ml en PBS)

Tubos eppendorf de 1.5 ml

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Centrífuga

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

2.1 Preparación de los reactivos:

1. Preparar cada día la solución reactiva de TdT en un volumen múltiplo de 30 μl mezclando las siguientes proporciones: 18 partes de tampón TdT + 1 parte de dUTP-FITC + 1 parte de TdT (para una alícuota de 30 μl : 27 μl de tampón + 1.5 μl de dUTP-FITC + 1.5 μl de TdT). Conservar en hielo hasta su uso.
2. Preparar cada día la solución para el control negativo, mezclando tampón TdT y dUTP-FITC en la proporción 19:1 (para una alícuota de 30 μl : 28.5 μl de tampón y 1.5 μl de dUTP-FITC). Conservar en hielo hasta su uso.

2.2. Fijación de las células:

1. Obtener una suspensión celular como se describe en los protocolos anteriores para los diferentes tipos de muestras. Ajustar a $1-2 \times 10^6$ células por test.
2. Transferir la suspensión celular a un tubo eppendorf de 1.5 ml y lavar dos veces con PBS-BSA.
3. Decantar el sobrenadante, resuspender el botón celular y fijarlo con 200 μl de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a 4°C .

2.3 Conservación (opcional) de las células fijadas:

1. Resuspender el botón celular en 200 μl de glicerol al 60% en PBS.
2. Conservar hasta 24 horas en congelador a -20°C .
3. Descongelar y añadir 800 μl de PBS-BSA.
4. Lavar dos veces con PBS-BSA.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con el vórtex.

2.4 Permeabilización de las células:

1. Resuspender cuidadosamente el botón celular en 200 μ l de etanol 70% helado.
2. Incubar durante 30 minutos a -20°C .
3. Centrifugar y lavar dos veces con PBS-BSA. Desechar el sobrenadante.

2.5 Marcaje fluorescente de las roturas de DNA:

1. Resuspender el botón celular y añadir 30 μ l de la solución reactiva de TdT o añadir 30 μ l de la solución de control negativo al tubo correspondiente.
2. Incubar 1 hora a 37°C y en oscuridad.
3. Añadir 1 ml de PBS-BSA.
4. Centrifugar y lavar una vez con PBS-BSA.
5. Resuspender el botón celular en 500 μ l de PBS-BSA.
6. Añadir 5 μ l de solución de contraste de yoduro de propidio.
7. Incubar 30 minutos a 37°C y oscuridad.
8. Analizar en el citometro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. La solución de TdT y el tampón de TdT contienen un derivado tóxico del arsénico, por lo que se debe manejar y eliminar con precaución.
2. Para cada muestra individual se deben procesar dos tubos, uno de los cuales corresponde al control negativo de la técnica, incubado en ausencia de TdT.
3. Los reactivos de la técnica son lábiles, por lo que se deben preparar diariamente e inmediatamente antes de su uso, manteniéndolos en hielo. El resto de las soluciones stock se deben conservar a -20°C , evitando ciclos de descongelación/congelación.
4. La validación de la técnica requiere controles biológicos negativos y positivos. Como controles negativos pueden usarse células mononucleares o suspensiones celulares experimentales (Raji, Jurkat, etc.) con viabilidad igual o mayor al 95%. Como controles positivos, se pueden usar suspensiones celulares tratadas con DNasa I (1 μ g/ml en tampón TdT durante 1 hora a 37°C).

ANALISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DEL ANTIGENO MITOCONDRIAL 7A6 (Apo2.7)

1. Material:

Anticuerpo Apo 2.7 conjugado con PE o PE-Cy5 (Immunotech)
Control isotípico (IgG1)
PBS
PBS-BSA 0.2%
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Centrífuga
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener suspensiones de células individuales, como se indica en los procedimientos anteriores.
2. Centrifugar aproximadamente 10^6 células y desechar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón celular y añadir 100 μ l de IntraPrep-Reactivo 1 (reactivo de fijación) y agitar con vórtex.
4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
5. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
6. Añadir al botón celular 20 μ l de anticuerpo APO 2.7 y 100 μ l de IntraPrep-Reactivo 2 y agitar suavemente.
7. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar suavemente de vez en cuando sin utilizar vórtex.
8. Lavar con PBS-BSA y decantar el sobrenadante. Resuspender el botón celular en 0.5-1 ml de PBS
9. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

***DETECCION POR CITOMETRIA DEL FRAGMENTO
PROTEOLITICO p85 DE LA POLI-(ADP-RIBOSA)
POLIMERASA (PARP)***

1. Material:

Anticuerpo policlonal anti PARP-p85 (Promega)
Anticuerpo Goat Anti-Rabbit conjugado con FITC (Sigma)
Anticuerpo CD95 inductor de apoptosis (Immunotech)
PBS
PBS+Azida sódica 0.1%+-SBF 5% (PBS-A)
Kit de fijación-permeabilización Fix & Perm (Caltag)
Metanol
yoduro de propidio (1 mg/mL)
Tubos eppendorf de 1.5 ml
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Vórtex
Centrífuga
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Inducir apoptosis en cultivos de células Jurkat por tratamiento con anticuerpo CD95.
2. Obtener suspensiones de células individuales, como se indica en los procedimientos anteriores.
3. Centrifugar aproximadamente 10^6 células y desechar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón celular y añadir 100 μ l de Fix & Perm Reactivo A (reactivo de fijación) y agitar con vórtex.
4. Incubar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 4 mL de metanol helado, gota a gota y agitando sobre el vórtex
6. Incubar durante 10 minutos a 4°C.
7. Centrifugar 10 minutos a 350 g.
8. Lavar con PBS-A y repetir la centrifugación. Decantar el sobrenadante.
9. Añadir al botón celular 5 μ l de anticuerpo antiPARP y 100 μ l de Fix & Perm Reactivo A (reactivo de permeabilización) y agitar suavemente.
10. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar suavemente de vez en cuando sin utilizar vórtex.
11. Lavar con PBS-A y decantar el sobrenadante.
12. Añadir al botón celular 5 μ l de anticuerpo GAR-FITC y agitar suavemente.
13. Lavar con PBS-A y decantar el sobrenadante.
14. Resuspender el botón celular en 1 ml de PBS y añadir 50 μ L de solución de yoduro de propidio.
15. Incubar 30 min. a temperatura ambiente.
16. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.