

ANALISIS CITOMETRICO DEL CONTENIDO EN DNA EN SANGRE Y MEDULA OSEA

1. Material:

Sistema DNA-Prep (Beckman-Coulter)

- **DNA-Prep LPR:** Reactivo de lisis de los eritrocitos y permeabilización de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reactivo de yoduro de propidio y RNasa

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

Filtros de nylon de 35-60 μm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Determinar la concentración leucocitaria de la muestra con un contador celular o hemocitómetro. Si es necesario añadir RPMI o eliminar plasma hasta que la concentración esté en el rango de $1-10 \times 10^6$ células/ml.
2. Añadir 100 μl de muestra a cada tubo.
3. Procesar cada tubo en el sistema DNA-Prep utilizando la opción "CYCLE".
4. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad o dejar una noche a 4°C.
5. Filtrar a través de malla de nylon.
6. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. En la mayor parte de los casos, se puede obviar el recuento celular previo. Se recomienda ajustar la concentración en caso de síndromes linfoproliferativos o de inmunodeficiencias.
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 DEL CONTENIDO EN DNA EN SUSPENSIONES CELULARES

1. Material:

Sistema DNA-Prep (Beckman-Coulter)

- **DNA-Prep LPR:** Reactivo de lisis de los eritrocitos y permeabilización de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reactivo de yoduro de propidio y RNasa

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

PBS

Etanol 70% (mantener a -20°C)

Filtros de nylon de 35-60 μm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener suspensiones de células individuales a partir de cultivos celulares en monocapa o en suspensión.
2. Centrifugar las suspensiones y lavar una vez con medio de cultivo o PBS.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con el vórtex.
4. Fijar las células añadiendo gota a gota 1 ml de etanol 70% helado, manteniendo el tubo en agitación con vórtex.
5. Mantener a -20°C al menos durante 1 hora.
6. Lavar una vez la suspensión de células fijadas con PBS y decantar el sobrenadante.
3. Procesar el tubo con el botón celular en el sistema DNA-Prep utilizando la opción "CYCLE".
4. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad o dejar una noche a 4°C .
5. Filtrar a través de malla de nylon.
6. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Se puede obviar la fijación de las células con etanol. Sin embargo, este procedimiento permite conservar las células durante varias semanas en congelador (-20°C) antes de su análisis. Además, la permeabilización inducida por el etanol es necesaria para otros procedimientos analíticos (marcaje de proteínas totales, determinación de células apoptóticas con contenido subdiploide de DNA), etc., que se podrían aplicar a la misma muestra.
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 DEL CONTENIDO EN DNA EN CULTIVOS EN MONOCAPA

1. Material:

Solución hipotónica de propidio:

- Citrato trisódico.5H₂O: 100 mg
 - Tritón X-100: 100 µl
 - Yoduro de propidio: 5 mg
 - RNasa A: 100 mg
 - H₂O bidestilada: 100 ml
- Mantener en nevera y oscuridad

Pipetas Pasteur

Filtros de nylon de 35-60 µm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Eliminar cuidadosamente el medio de cultivo de los frascos o placas de cultivo en monocapa.
2. Añadir un volumen igual de la solución hipotónica de propidio.
3. Incubar en nevera (4°C) durante 12-24 horas, procurando que los frascos/placas estén perfectamente horizontales.
4. Resuspender cuidadosamente con pipeta Pasteur los núcleos liberados por el tratamiento.
5. Filtrar a través de malla de nylon.
6. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Este método sencillo no es recomendable cuando se quiere estimar simultáneamente la proliferación celular y la apoptosis mediante la determinación del contenido en DNA, puesto que las células apoptóticas (y necróticas) se desprenden rápidamente de la monocapa. Si se desea estimar el grado de apoptosis, se debe conservar el sobrenadante decantado, centrifugarlo, resuspenderlo en 500 µl de solución hipotónica de propidio y añadir esta suspensión a la monocapa en incubación.
2. Cuando se trata de frascos de cultivo de tipo Falcon, se puede acelerar la resuspensión de los núcleos golpeando con la mano la base del frasco. En cualquier caso, hay que evitar producir espuma en el procedimiento de resuspensión, para evitar la destrucción de núcleos.
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 DEL CONTENIDO EN DNA EN TEJIDOS FRESCOS

1. Material:

Sistema DNA-Prep (Beckman-Coulter)

- **DNA-Prep LPR:** Reactivo de lisis de los eritrocitos y permeabilización de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reactivo de yoduro de propidio y RNasa

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

PBS

Etanol 70% (mantener a -20°C)

Filtros de nylon de 35-60 μm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Colocar la muestra limpia en una placa de Petri, añadir 1 ml de RPMI 1640 y disgregar completamente el material (tumor sólido, ganglio, etc.) con bisturí.
2. Filtrar la suspensión a través de malla de nylon
3. Ajustar la concentración celular en el rango de $1-10 \times 10^6$ células/ml.
4. Centrifugar la suspensión celular y lavar una vez con medio de cultivo o PBS.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con el vórtex.
6. Fijar las células añadiendo gota a gota 1 ml de etanol 70% helado, manteniendo el tubo en agitación con vórtex.
7. Mantener a -20°C al menos durante 1 hora.
8. Lavar una vez la suspensión de células fijadas con PBS y decantar el sobrenadante.
9. Procesar el tubo con el botón celular en el sistema DNA-Prep utilizando la opción "CYCLE".
10. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad o dejar una noche a 4°C .
11. Filtrar a través de malla de nylon.
12. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. Se puede obviar la fijación de las células con etanol. Sin embargo, este procedimiento permite conservar las células durante varias semanas en congelador (-20°C) antes de su análisis. Además, la permeabilización inducida por el etanol es necesaria para otros procedimientos analíticos (marcaje de proteínas, determinación de células apoptóticas con contenido subdiploide de DNA), etc., que se podrían aplicar a la misma muestra.
2. La incubación de las muestras a 4°C durante 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 DEL CONTENIDO EN DNA EN TEJIDOS FIJADOS Y PARAFINADOS

1. Material:

Bloques de tejido fijado e incluido en parafina.

Microtomo preparado para realizar cortes de 4 μm y 50 μm .

Solución de Hematoxilina-Eosina para análisis microscópico.

Tubos de vidrio de 15 mL.

Vidrio de reloj o portas desengrasados y placas de Petri de 10 cm.

Bisturí.

Tijeras de punta fina.

Xileno (Xilol): Calidad para análisis.

Soluciones de etanol/agua de las siguientes concentraciones (v/v): 100% (absoluto), 95%, 90%, 70%, 50%.

Agua destilada.

Solución salina fisiológica (ClNa al 0.9% p/v).

Acido clorhídrico (Calidad para análisis): Preparar una solución 2N.

Solución de pepsina (Sigma): preparar una solución al 0.5% p/v en solución salina fisiológica tamponada a pH 1.5 con ClH 2N. Preparar fresca cada vez.

Pipetas Pasteur de vidrio

Tubos de polipropileno de 12x75 mm (Tubos de citómetro)

Baño termostataado con agitación

Agitador de tubos (Vórtex)

Filtros de nylon de 50 μm de diámetro

Centrífuga clínica

Solución salina tamponada de fosfatos (PBS)

Reactivos DNA-Prep (Beckman-Coulter):

- **DNA-Prep LPR:** Reactivo de lisis de los eritrocitos y permeabilización de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reactivo de yoduro de propidio y RNasa

(Opcional) Solución hipotónica de tinción de DNA: Preparar una solución de citrato trisódico pentahidratado al 0.1% p/v que contenga 0.1% v/v de Triton X-100, 50 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio y 1 mg/mL de RNasa A (libre de DNasa). Conservar a 4°C en frasco oscuro)

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Numerar y registrar los bloques de parafina que contienen la muestra tumoral a analizar.
2. De cada bloque, realizar tres cortes sucesivos con el microtomo: el primero de 4 μm (para microscopía), el segundo de 50 μm (para citometría) y el tercero de 4 μm (para microscopía).

PROLIFERACION CELULAR

3. Procesar los dos cortes de 4 μm para microscopía óptica: teñirlos con solución de hematoxilina-eosina para confirmar la existencia de neoplasia en el corte de 50 μm y obtener los datos histológicos de la muestra.
4. Rotular de forma indeleble tubos secos de vidrio y colocar en cada uno de ellos un corte de 50 μm . Mantener en el mismo tubo a lo largo de los procedimientos de desparafinado y rehidratación.
5. Proceder a desparafinar los cortes: añadir 10 mL de xileno a cada tubo e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Decantar por completo el líquido y añadir otros 10 mL de xileno. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Decantar por completo el líquido.
6. Eliminar los restos de xileno de los tubos mediante dos lavados sucesivos con 10 mL de etanol absoluto.
7. Proceder a rehidratar a temperatura ambiente los cortes desparafinados:
 - Añadir 10 mL de etanol al 100% e incubar durante 5 minutos. Decantar.
 - Añadir 10 mL de etanol al 95% e incubar durante 5 minutos. Decantar.
 - Añadir 10 mL de etanol al 70% e incubar durante 5 minutos. Decantar.
 - Añadir 10 mL de etanol al 50% e incubar durante 10 minutos. Decantar.
 - Añadir 10 mL de agua destilada. Mantener durante 8 horas.
8. Proceder a disgregar mecánicamente los cortes rehidratados:
 - Depositar cada corte en un vidrio de reloj seco. Alternativamente, colocar un porta limpio en el interior de una placa de Petri y depositar el corte rehidratado sobre el porta.
 - Añadir unas gotas de la solución de pepsina/CIH sobre el corte y proceder a triturarlo con bisturí o con tijeras de punta fina y afilada. Triturar hasta obtener una homogenado fluido. Adicionar más solución de tripsina si fuera preciso.
 - Transferir el homogenado a un tubo de polipropileno de 12x75 mm limpio (tubo de citómetro), recogiendo bien los restos con ayuda de más solución de pepsina.
 - Completar hasta 2 mL con solución de pepsina.
9. Incubar a 37°C durante 30 minutos en baño con agitación. Alternativamente, incubar en baño estático y agitar los tubos con vórtex cada 5 minutos.
10. Añadir a cada tubo 2 mL de PBS frío para detener la acción de la pepsina.
11. Filtrar la suspensión a través de malla de nylon de 50 μm de diámetro.
12. Determinar la concentración de núcleos en suspensión mediante un hemocitómetro u otro sistema de recuento absoluto. Calcular el volumen para manejar como máximo 1-2 x 10E6 núcleos en el siguiente paso
13. Centrifugar la suspensión filtrada a 300 g durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante cuidadosamente.
14. Resuspender el precipitado y añadir 100 μL de reactivo DNA-Prep LPR. Agitar con vórtex durante unos segundos. Añadir 2 mL de reactivo DNA-Prep Stain. Alternativamente, en lugar de los reactivos DNA-Prep, añadir 2 mL de solución hipotónica de tinción de yoduro de propidio con Rnasa.
15. Incubar al menos 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Alternativamente, mantener durante la noche a 4°C .
16. Analizar en el citometro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. La incubación de las muestras a 4°C durante la noche mejora la calidad de la tinción.
2. Analizar siempre utilizando una baja velocidad de flujo en el citómetro. En caso de baja celularidad, se puede acelerar la velocidad de análisis de la muestra centrifugando la suspensión de células teñidas y eliminando parte del sobrenadante antes de resuspender el precipitado.
3. Las muestras con abundante celularidad pueden resultar en tinción insuficiente del DNA celular. Se recomienda no sobrepasar la concentración de núcleos indicada en el punto 12 del protocolo. La experiencia en el procedimiento habituará al usuario a estimar la riqueza celular en función del tamaño del precipitado obtenido: un pequeño anillo en el fondo suele ser correcto; un precipitado visible suele ser excesivo. La turbidez de la suspensión suele ser un buen indicador: una suspensión opaca indica un exceso de células; una suspensión limpia apenas opalescente suele ser correcta. El exceso de celularidad puede llegar a producir un precipitado fuertemente coloreado y un sobrenadante de color más tenue que el de la solución original de tinción. Una suspensión totalmente transparente en la que se lleguen a observar a simple vista formas puntiformes o filiformes indica escasa celularidad y disgregación insuficiente.

ANALISIS SIMULTANEO DEL CONTENIDO EN DNA Y EL FENOTIPO DE SUPERFICIE

1. Material:

Anticuerpos conjugados (FITC o PC5) contra los antígenos de elección
Controles isotípicos adecuados a los anticuerpos monoclonales utilizados
IntraPrep Permeabilization Reagent (Immunotech)
Reactivo DNA-Prep Stain (Beckman-Coulter): Diluir 1:10 en PBS
Solución de yoduro de propidio (5 µg/ml en PBS, conservada a 4°C en oscuridad)
Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo
PBS
Filtros de nylon de 35-60 µm de diámetro
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Hemocitómetro
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión celular (no fijada) como se describe en los protocolos anteriores para los diferentes tipos de muestras de interés.
2. Dispensar 10 µl de anticuerpo monoclonal conjugado en un tubo de 12x75 mm. Añadir 100 µl de muestra (5 x 10⁵) y agitar en vórtex durante unos segundos.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Añadir 100 µl de IntraPrep-Reactivo 1 (reactivo de fijación) y agitar con vórtex.
5. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
6. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
7. Añadir al botón celular 100 µl de IntraPrep-Reactivo 2 y agitar suavemente.
8. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar suavemente de vez en cuando sin utilizar vórtex.
9. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
10. Resuspender el botón celular en 1 ml de reactivo DNA-Prep Stain diluido o de solución de yoduro de propidio.
11. Incubar en oscuridad 1 hora a temperatura ambiente o dejar una noche a 4°C.
12. 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 SIMULTANEO DEL CONTENIDO EN DNA Y DE PROTEINAS TOTALES

1. Material:

Sistema DNA-Prep (Beckman-Coulter)

- **DNA-Prep LPR:** Reactivo de lisis de los eritrocitos y permeabilización de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reactivo de yoduro de propidio y RNasa

Solución de tinción de proteínas (FITC 1 mg/ml en tampón CO₃HNa pH 8)

PBS

Etanol 70% (mantener a -20°C)

Filtros de nylon de 35-60 µm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Baño de hielo

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión celular como se describe en los protocolos anteriores para los diferentes tipos de muestras de interés.
2. Filtrar la suspensión a través de malla de nylon
3. Ajustar la concentración celular en el rango de 1-10 X 10⁶ células/ml.
4. Centrifugar la suspensión celular y lavar una vez con medio de cultivo o PBS.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular con el vórtex.
6. Fijar las células añadiendo gota a gota 1 ml de etanol 70% helado, manteniendo el tubo en agitación con vórtex.
7. Mantener a -20°C al menos durante 1 hora.
8. Lavar una vez la suspensión de células fijadas con PBS y decantar el sobrenadante.
9. Procesar el tubo con el botón celular en el sistema DNA-Prep utilizando la opción "CYCLE".
10. Añadir a cada tubo 5 µl de solución de tinción de proteínas.
11. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad o dejar una noche a 4°C.
12. Filtrar a través de malla de nylon.
13. Analizar en el citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Sugerencias

1. La tinción de proteínas con FITC mejora la calidad de la resolución de los compartimentos del ciclo celular y no supone una complicación técnica en el procedimiento de análisis del contenido en DNA.
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 SIMULTANEO DEL CONTENIDO EN DNA Y LA EXPRESION DE ANTIGENOS DE PROLIFERACION

1. Material:

Anticuerpos conjugados (FITC o PC5) contra antígenos de proliferación (Ki-67, PCNA...)
Controles isotípicos adecuados a los anticuerpos monoclonales utilizados
IntraPrep Permeabilization Reagent (Immunotech)
Reactivo DNA-Prep Stain (Beckman-Coulter): Diluir 1:10 en PBS
Solución de yoduro de propidio (5 µg/ml en PBS, conservada a 4°C en oscuridad)
Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo
PBS
Filtros de nylon de 35-60 µm de diámetro
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Hemocitómetro
Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión celular (no fijada) como se describe en los protocolos anteriores para los diferentes tipos de muestras de interés.
2. Añadir 100 µl de IntraPrep-Reactivo 1 (reactivo de fijación) y agitar con vórtex.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
5. Añadir al botón celular 10 µl del anticuerpo correspondiente y 100 µl de IntraPrep-Reactivo 2 y agitar suavemente.
6. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar suavemente de vez en cuando sin utilizar vórtex.
7. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
8. Resuspender el botón celular en 1 ml de reactivo DNA-Prep Stain diluido o de solución de yoduro de propidio.
9. Incubar en oscuridad 1 hora a temperatura ambiente o dejar una noche a 4°C.
10. 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 SIMULTANEO DEL CONTENIDO EN DNA Y DE ANTIGENOS INTRACELULARES

1. Material:

Anticuerpos conjugados (FITC o PC5) contra antígenos intracelulares (enzimas, citokinas, proteínas estructurales,...)

Controles isotípicos adecuados a los anticuerpos monoclonales utilizados

IntraPrep Permeabilization Reagent (Immunotech)

Reactivo DNA-Prep Stain (Beckman-Coulter): Diluir 1:10 en PBS

Solución de yoduro de propidio (5 µg/ml en PBS, conservada a 4°C en oscuridad)

Medio de cultivo RPMI 1640 o análogo

PBS

Filtros de nylon de 35-60 µm de diámetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Hemocitómetro

Citómetro de Flujo

2. Procedimiento:

1. Obtener una suspensión celular (no fijada) como se describe en los protocolos anteriores para los diferentes tipos de muestras de interés.
2. Añadir 100 µl de IntraPrep-Reactivo 1 (reactivo de fijación) y agitar con vórtex.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
5. Añadir al botón celular 10 µl del anticuerpo correspondiente y 100 µl de IntraPrep-Reactivo 2 y agitar suavemente.
6. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Agitar suavemente de vez en cuando sin utilizar vórtex.
7. Lavar con PBS y decantar el sobrenadante.
8. Resuspender el botón celular en 1 ml de reactivo DNA-Prep Stain diluído o de solución de yoduro de propidio.
9. Incubar en oscuridad 1 hora a temperatura ambiente o dejar una noche a 4°C.
10. 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.