

Citometria: anàlisi de poblacions cel·lulars

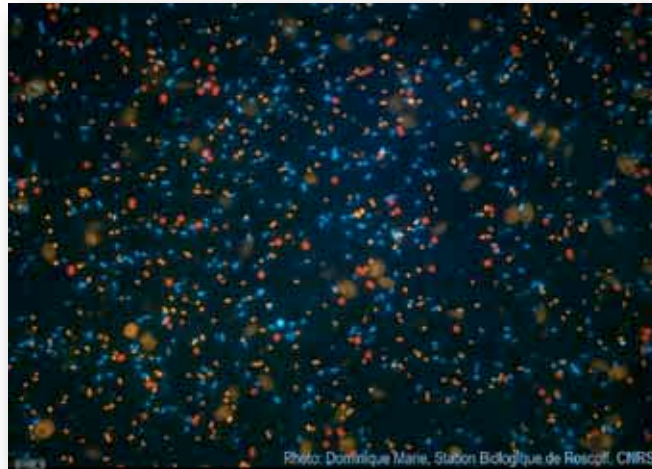
Jaume Comas
Centres Científics i
Tecnològics de la U.B.
desembre 2011

CCiT
Centres Científics i Tecnològics
UNIVERSITAT DE BARCELONA



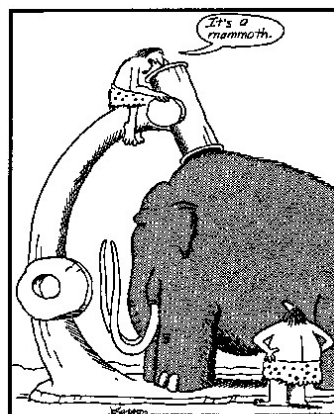
© National Geographic

■ Citometria: estadística sobre moltes cèl·lules...



Tècniques citomètriques

- microscòpia



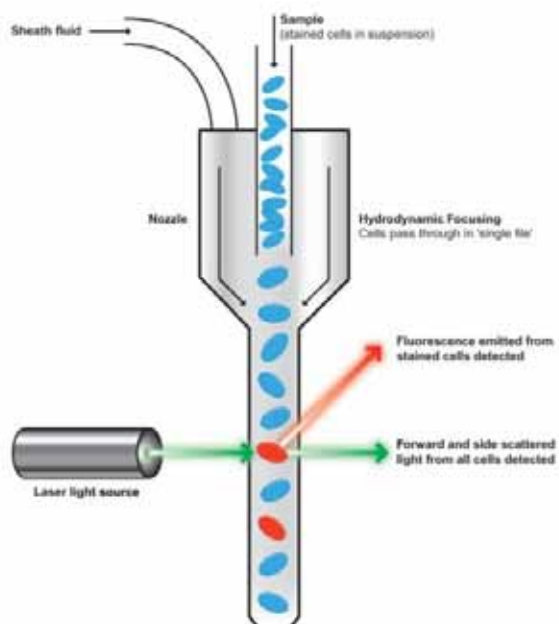
- citometria



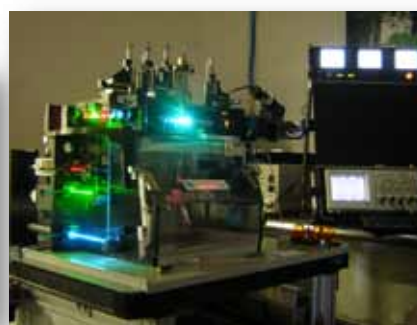
■ Citometria de flux:

Anàlisi i separació a alta velocitat

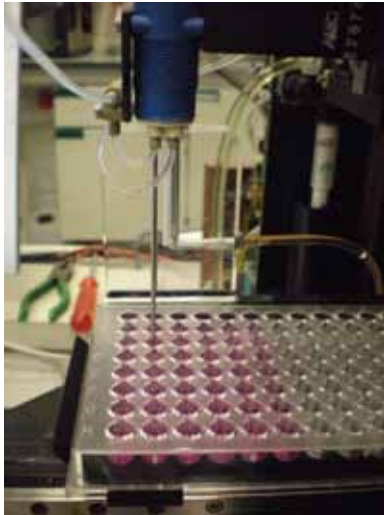
Múltiples làsers i detectors: anàlisi multiparamètrica



■ Citometria: evolució



■ Citometria: automatització “High throughput screening”



■ Citometria: purificació cel·lular



- separació a alta velocitat (70.000 cel/s)
- fins a 6 poblacions simultànies
- puresa >99%

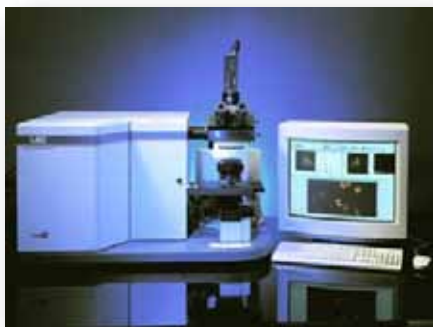


SEPARACIÓ ("Sorting") Quan necessitem cèl·lules "pures"?

- Purificació ADN/ARN → GENÒMICA
- Obtenció de proteïna → PROTEÒMICA
- Clonatge
- Cèl·lules mare
- Càncer (MMR – malaltia mínima residual)

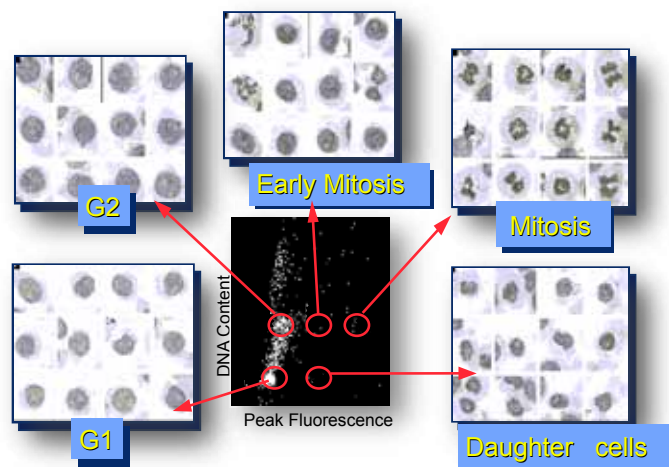
La separació cel·lular per citometria és una tècnica bàsica per a obtenir cèl·lules amb característiques homogènies.

■ Citometria: sistemes basats en imatge



cèl·lules fixades en una superfície:
LSC, Icyte (Compucyte),
Pathway (BD),
In Cell Analyzer 6000 (GE)

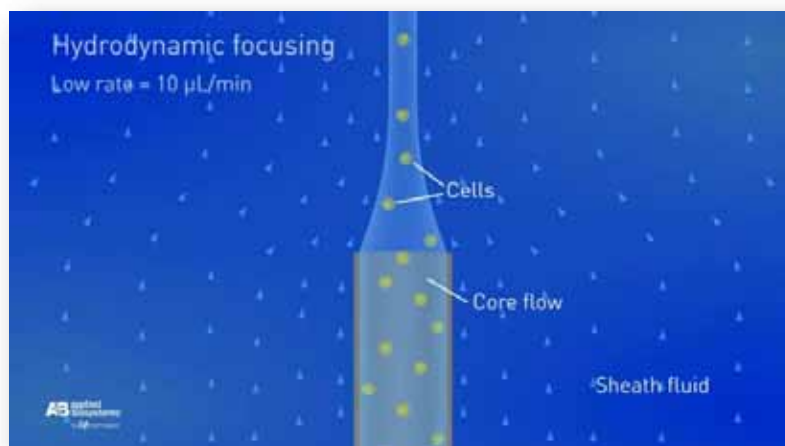
En flux: Imagestream,
Flowsight (Amnis)



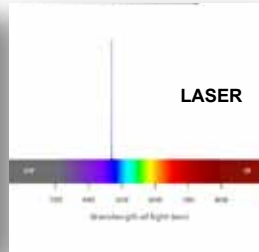
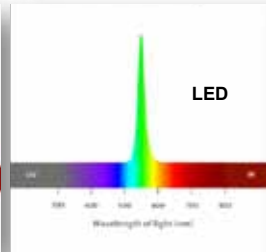
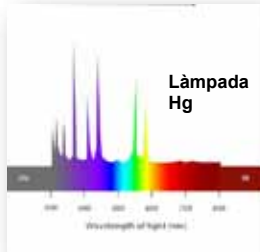
■ Funcionament d'un citòmetre de flux



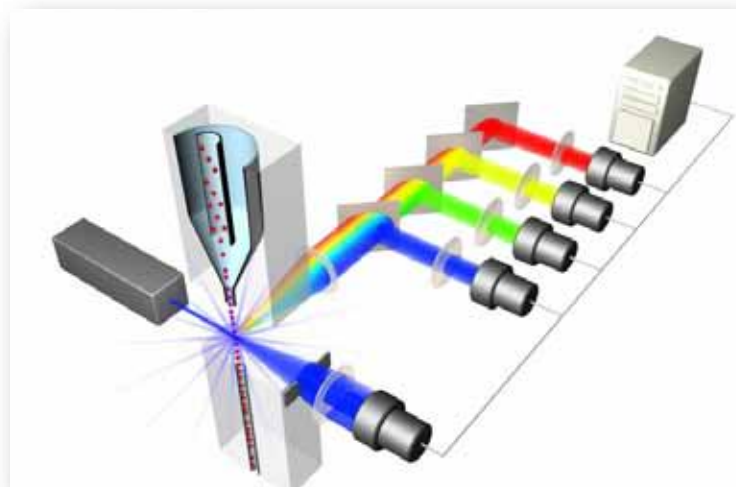
- **•Sistema hidràulic**
- Làzers/ òptiques



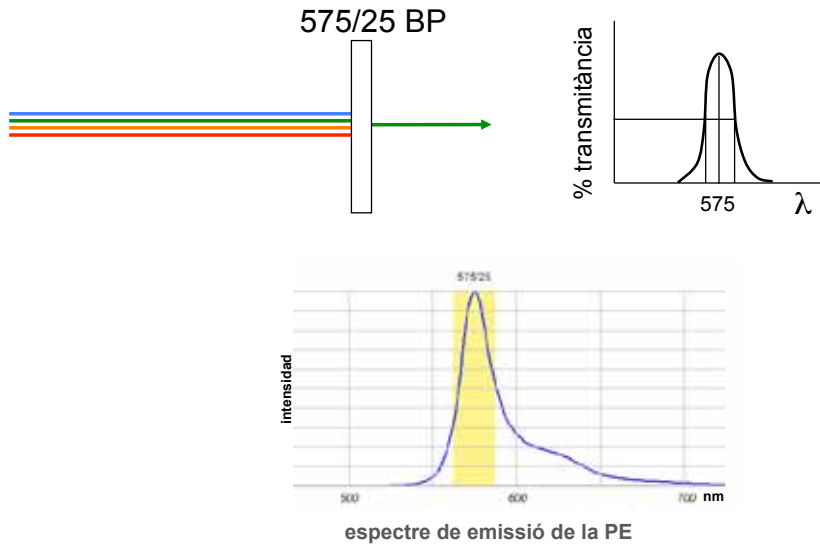
- Sistema hidràulic
- **Làzers/ òptiques**



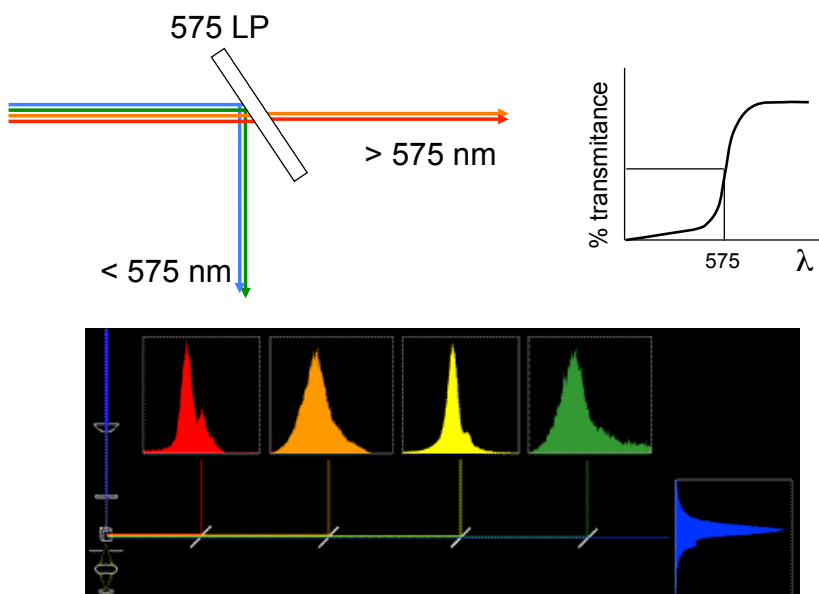
- Sistema hidràulic
- **Làzers/ òptiques**



■ filtres òptics: passos de banda



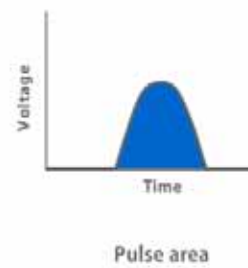
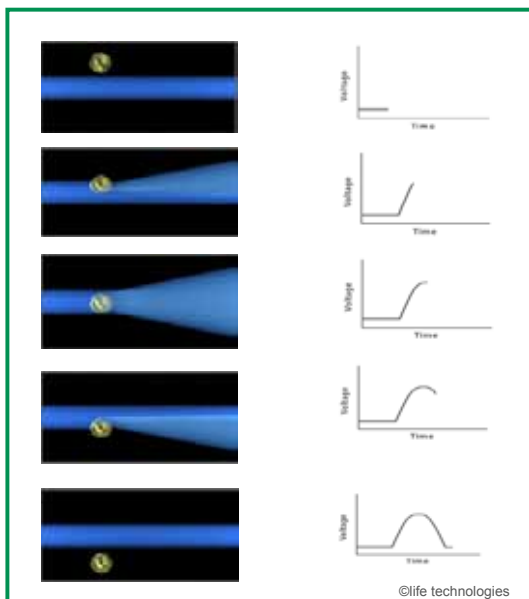
■ filtres òptics d'interferència i dicroics



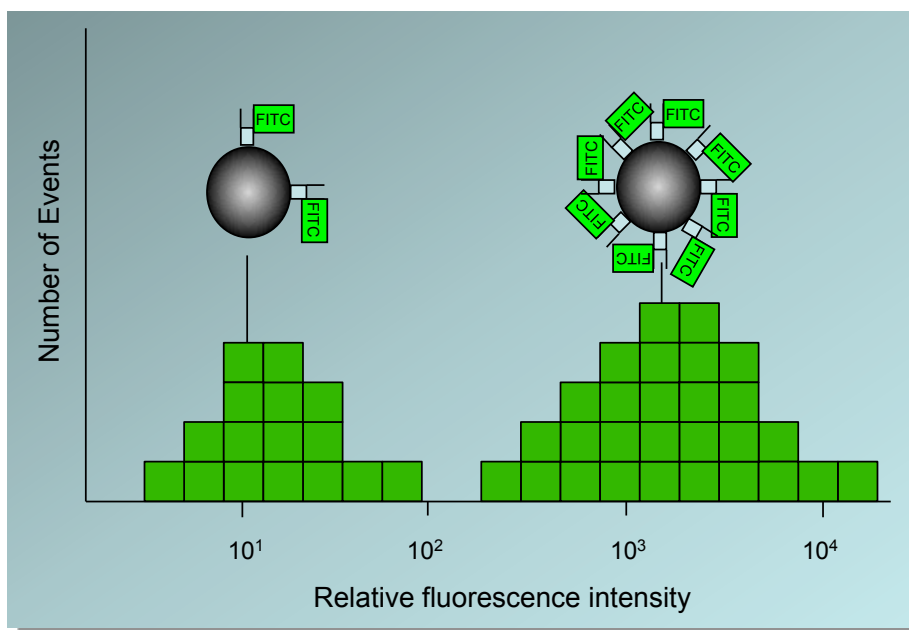
■ Presentació de resultats en citometria



■ Processament del senyal

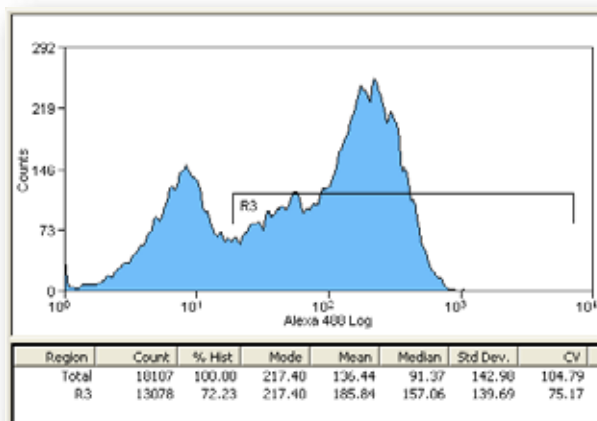


Representació de dades: histogrames

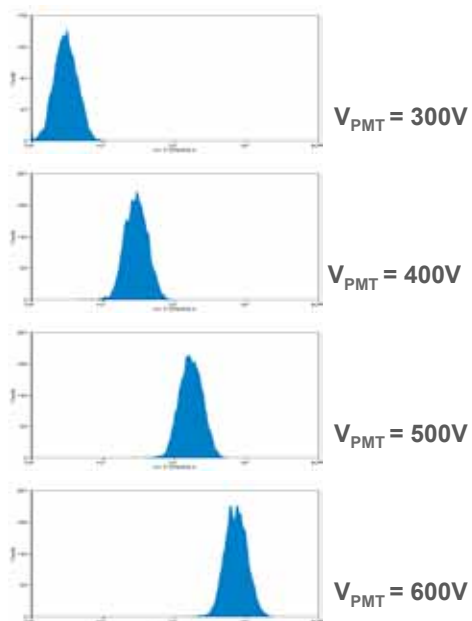


histogrames: estadístics associats

- de quantitat: percentage, nombre absolut
- de posició: mitjana, mediana, moda
- de dispersió: SD, CV, hpCV

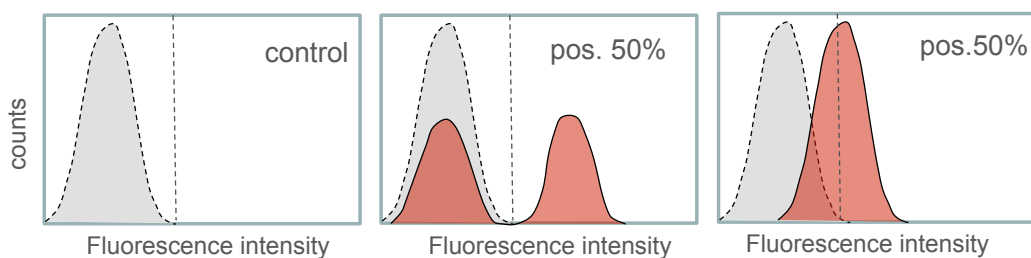


■ citometria: mesures quantitatives relatives

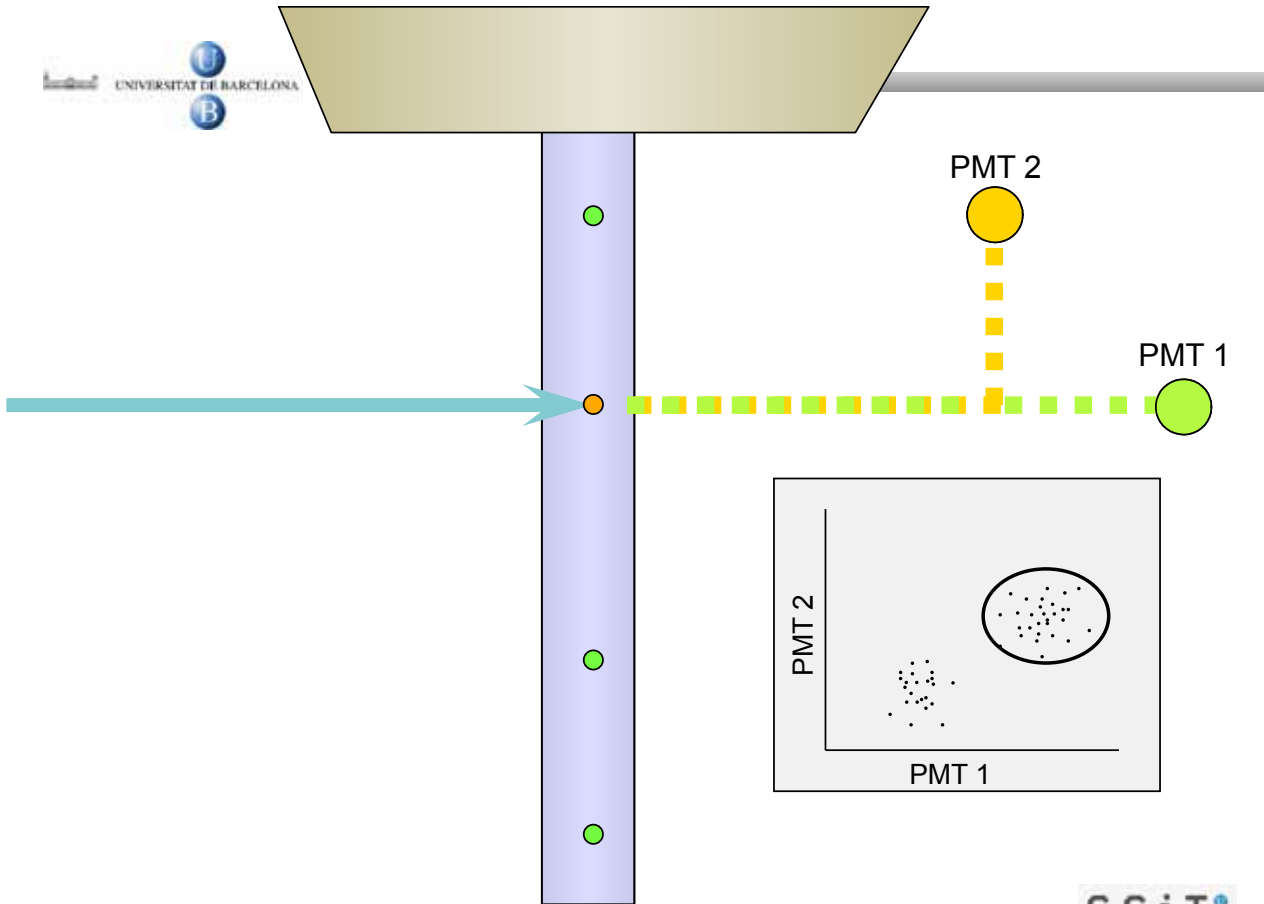


En citometria les mostres a comparar han de ser analitzades usant les mateixes condicions !

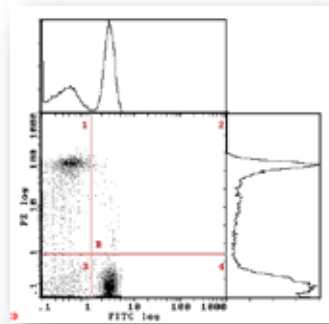
■ Informació de l'histograma: distribucions multi o monomodals



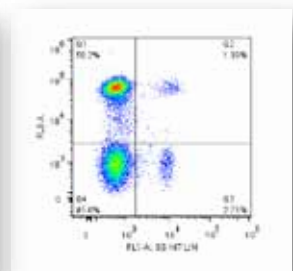
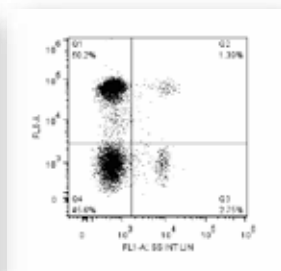
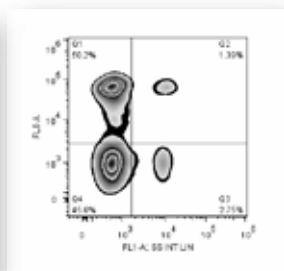
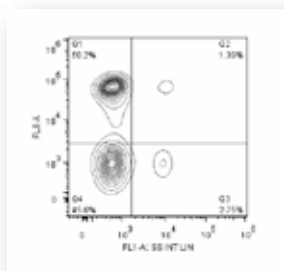
- poblacions heterogènies: percentatge
- poblacions homogènies: estadístics de posició (mitjana / mediana)



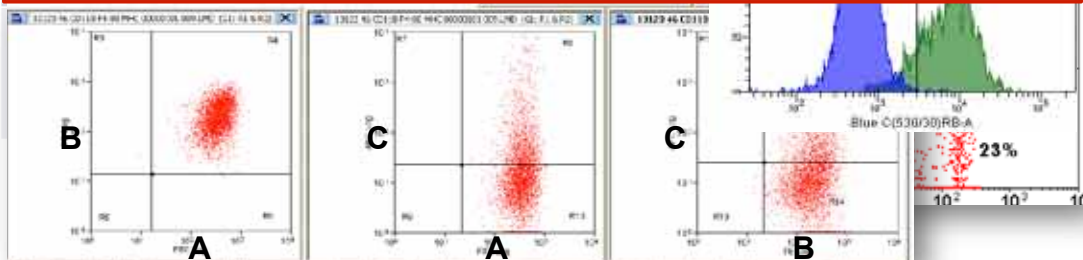
Histogrames biparamètrics:



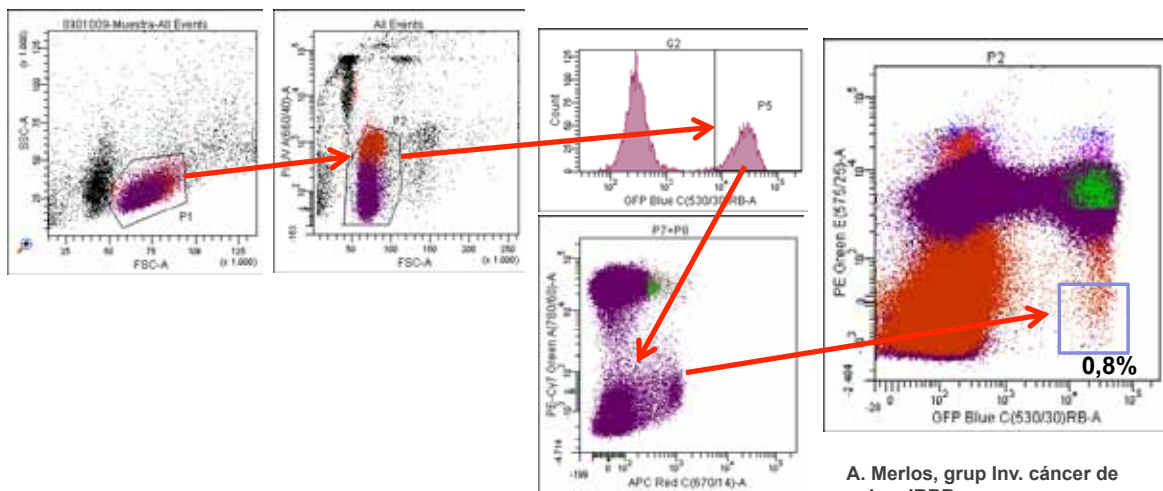
gràfiques de corbes, punts i densitats:



marcadors	poblacions	combinacions	representació
1 (A)	$(2^1) = 2$	+ / -	1 histograma 1P
2 (A, B)	$(2^2) = 4$	++ / +- + - / - + + / - -	
3 (A, B, C)	$(2^3) = 8$	+++ / ++ ++- / -++ + / ---	



Gating: estratègies de selecció

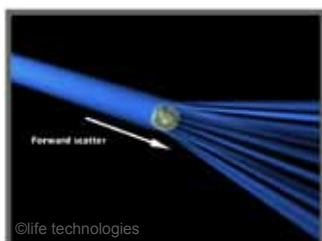


■ paràmetres mesurats en citometria:

- llum dispersada (“scatter”)
- fluorescència

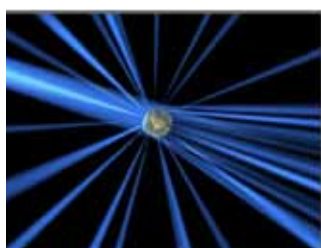


■ Paràmetres de refringència



Dispersió frontal:
forward scatter
FS / FSC

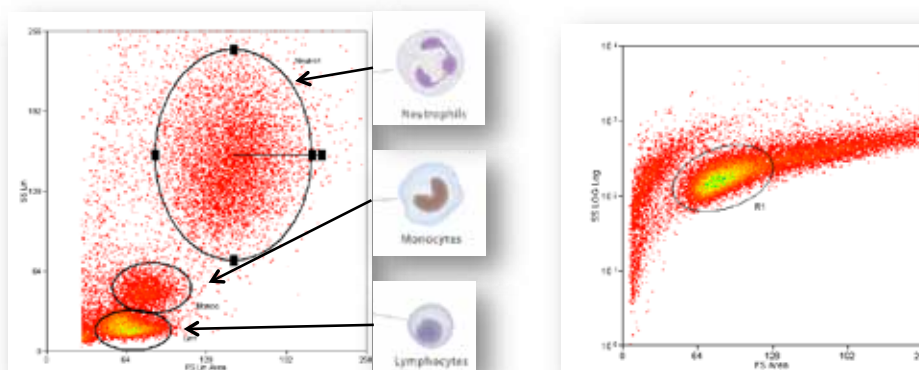
- El valor del FSC depèn de la mida i de l'índex de refracció de la cèl·lula



Dispersió lateral:
side scatter
SS / SSC

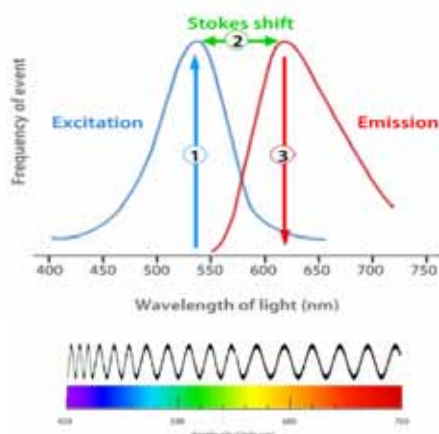
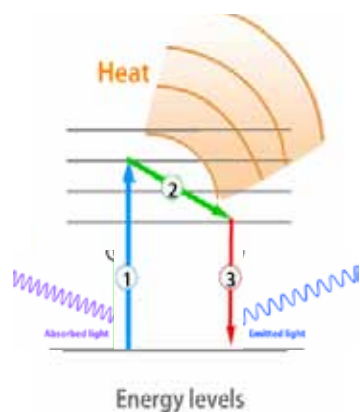
- El senyal de SSC és una mesura del grau d'estructura i de la granularitat cel·lular

Paràmetres de refringència: informació



- Selecció de poblacions específiques
- Distinció de:
 - cèl·lules mortes, restes cel·lulars
 - agregats

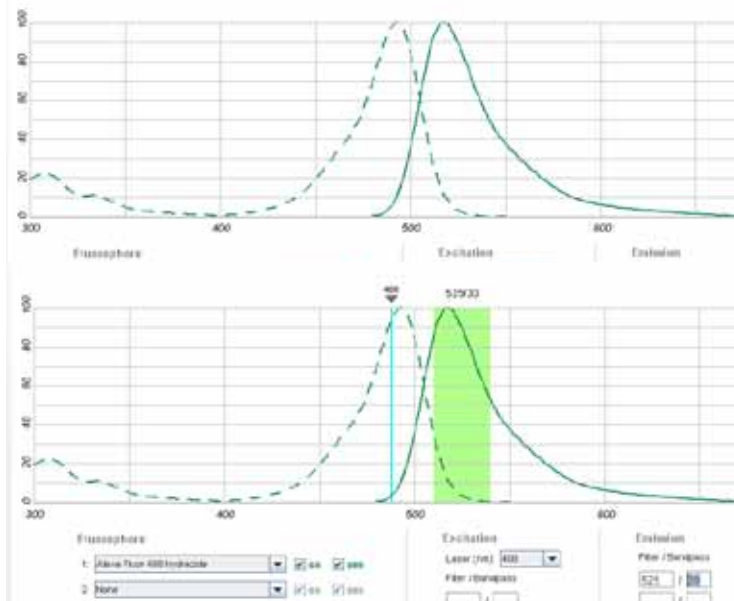
Fluorescència



Fluorocroms:

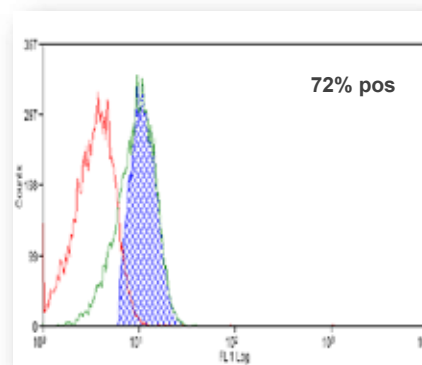
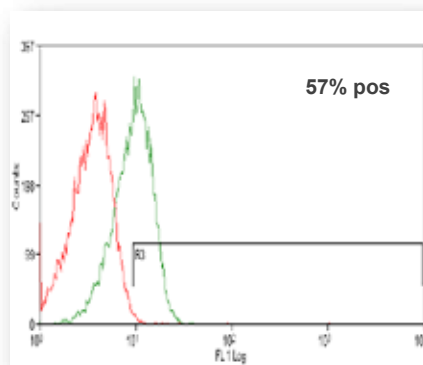
- espectre d'excitació/emissió
- especificitat de marcatge
- eficiència quàntica

Software de suport: fluorescence spectraviewer



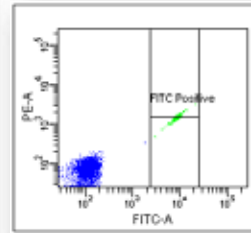
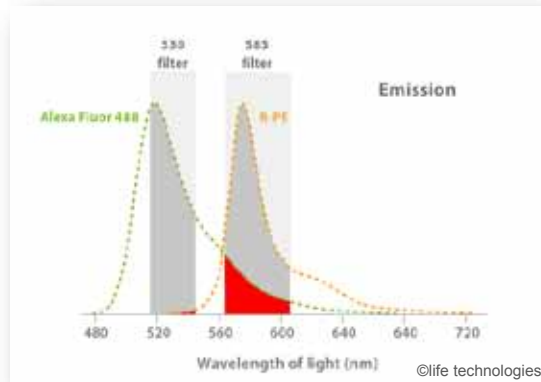
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

Fluorescència: controls negatius

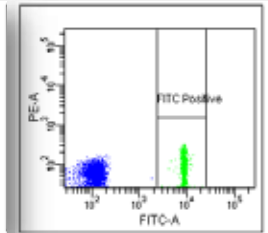


combinació de marcatges fluorescents: compensació

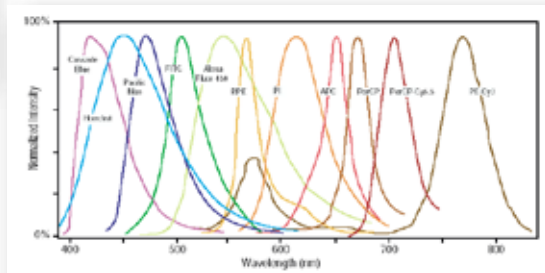
mostra amb marcatge simple (FITC)



No compensat



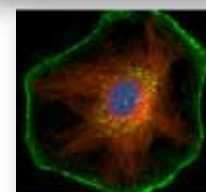
Compensat



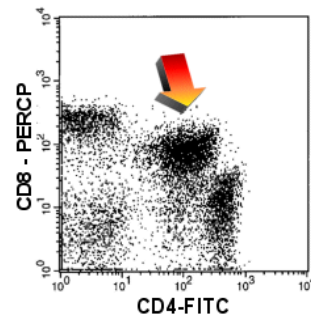
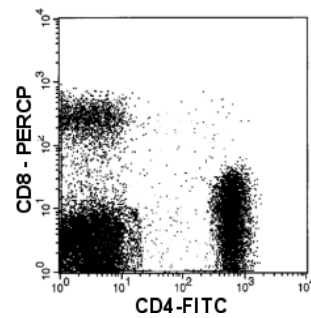
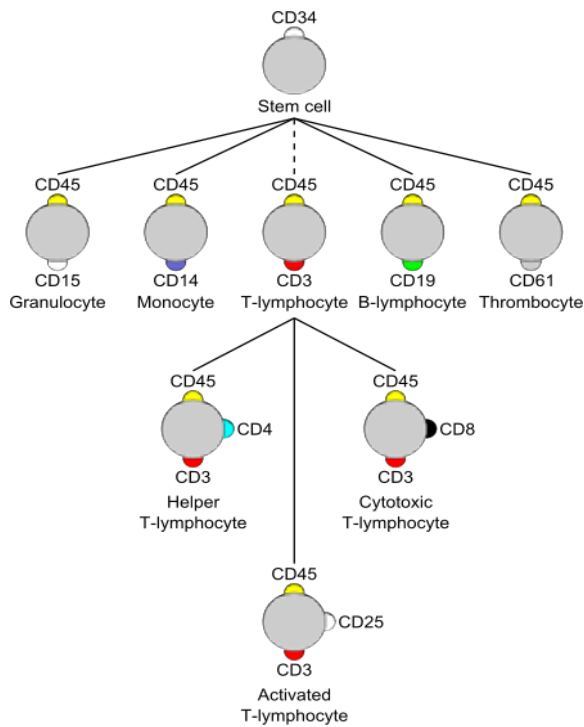
http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/5Data_Analysis/player.html
http://www.bdbiosciences.com/documents/An_Intro_to_Compensation_for_Multi_assays.pdf

Aplicacions de la citometria

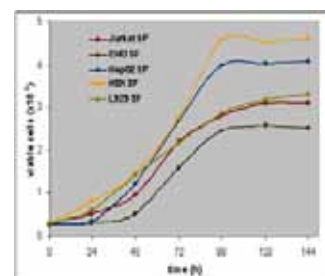
- Immunofluorescència
- Proliferació cel·lular i mesures d'ADN
- Funcionalitat cel·lular



■ Aplicacions clíniques en hematologia i immunologia: fenotipat de leucèmies i limfomes



Creixement cel·lular: proliferació - mortalitat



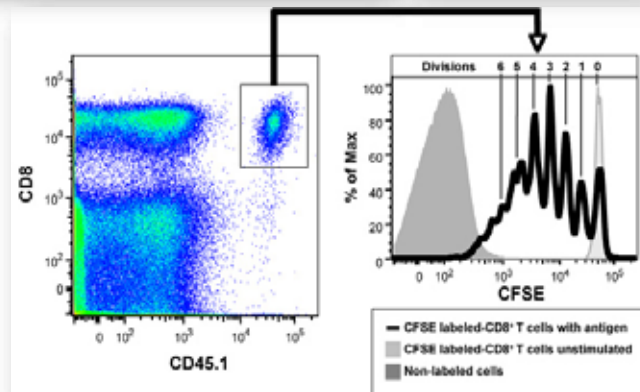
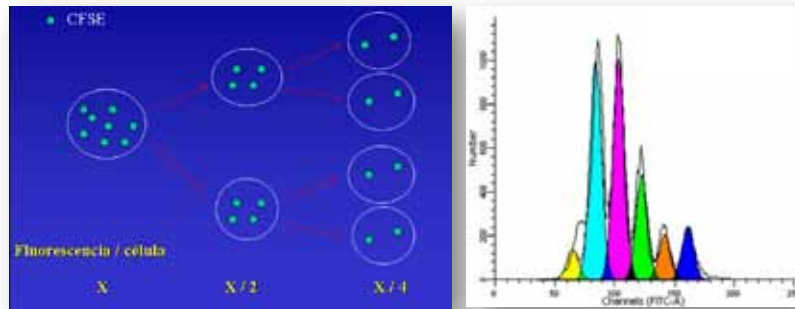
Mesures de proliferació:

- cycle cel·lular
- incorporació de BrdU
- recompte de mitosis
- "cell tracers": CFSE

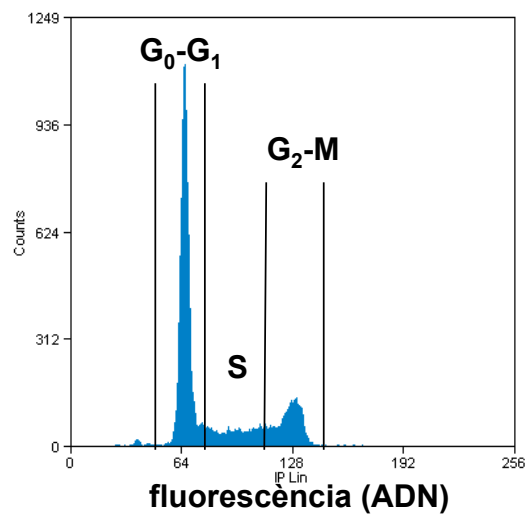
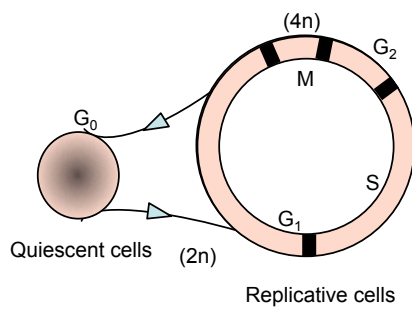
Mesures de mortalitat i vitalitat:

- permeabilitat de membrana
- apoptosi
- activitat enzimàtica

Activació limfocitària i proliferació amb "cell tracers"

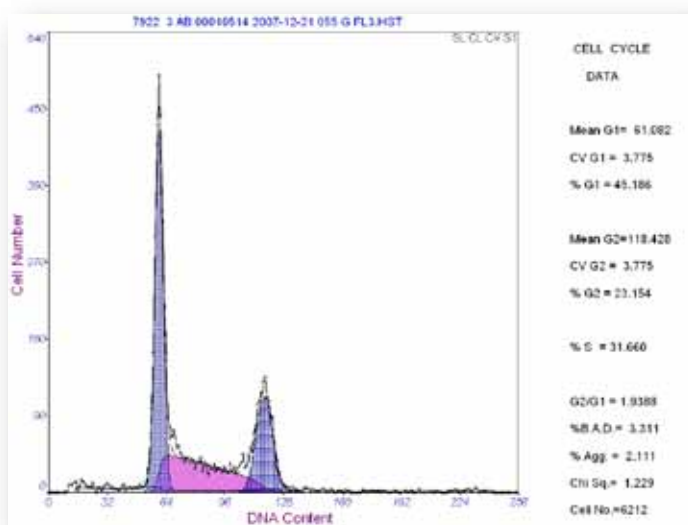


cicle cel·lular



L'anàlisi de cicle per citometria proporciona informació puntual del contingut d'ADN

Anàlisi de cicle cel·lular



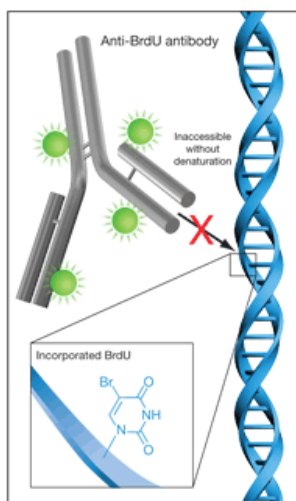
en cèl·lules permeabilitzades / nuclis:

- IP, BrEt
- Dapi, Ho33258
- acridine orange
- 7-AAD

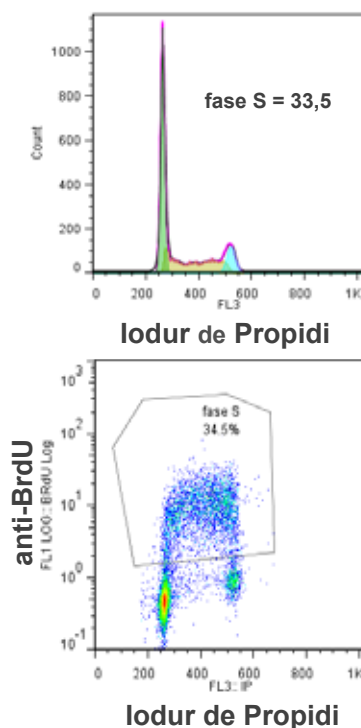
en cèl·lules vives:

- Ho33342
- Draq5
- Vybrant® Dyecycle™ stains (violet, green, orange)

Proliferació: Incorporació d'anàlegs de bases (BrdU)

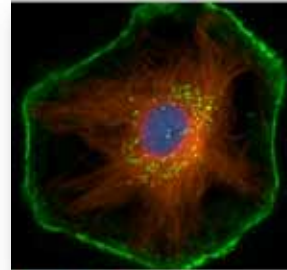


life technologies

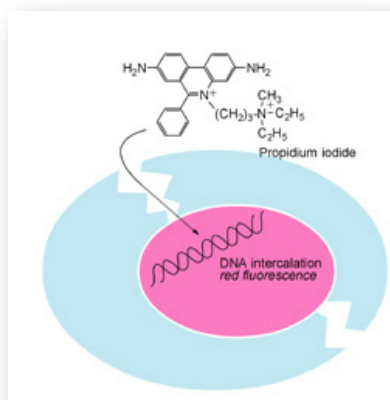


■ Funcionalitat cel·lular:

- viabilitat y vitalitat
- expressió gènica
- cinètiques enzimàtiques
- segons missatgers



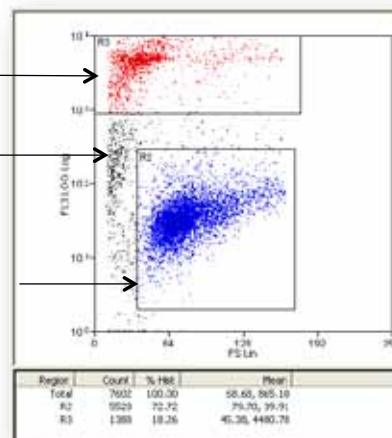
■ mesures de viabilitat: permeabilitat de membrana



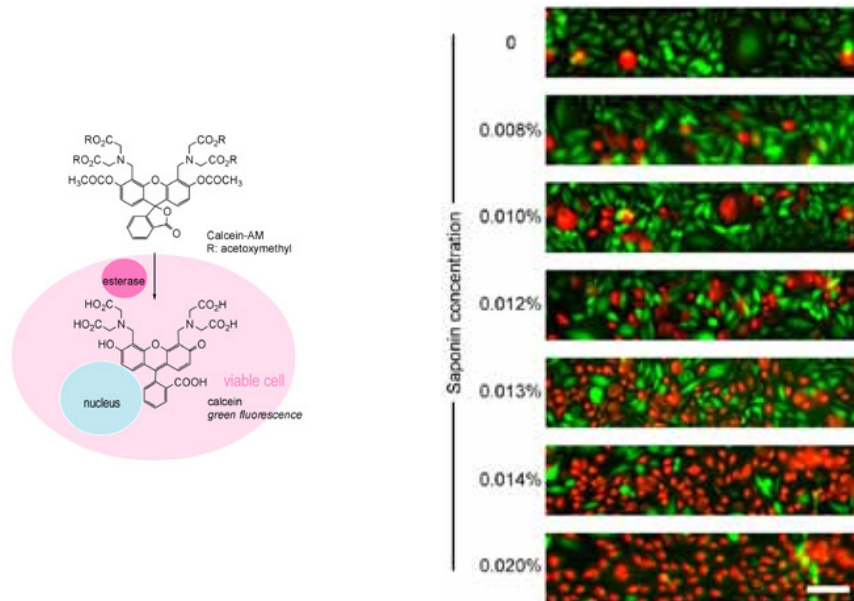
cel. mortes

restes cel·lulars

cèl. no permeabilitzades

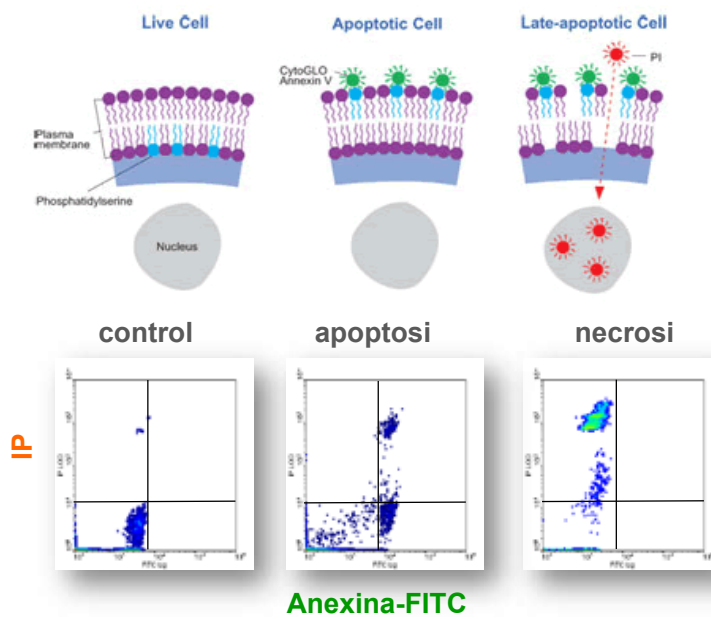


mesures de viabilitat: substrates d'esterases

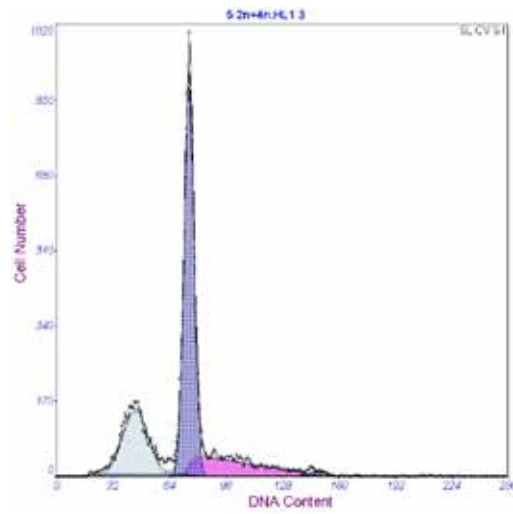
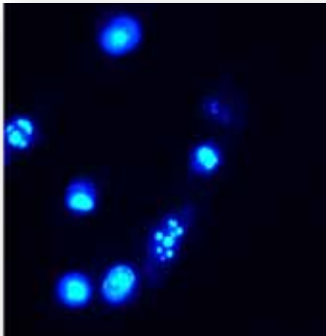


Hydrodynamic guiding for addressing subsets of immobilized cells and molecules in microfluidic systems.
Thomas Brevig et al., *BMC Biotechnology* 2003, 3:10

Apoptosi: translocació de membrana



apoptosi i cicle cel·lular



DIPLOID CYCLE

Mean G1 = 75.964
CV G1 = 3.742
% G1 = 75.363

Mean G2 = 149.319
CV G2 = 3.738
% G2 = 1.590
(1.377- 1.803)

% S = 23.047
(21.371- 24.723)

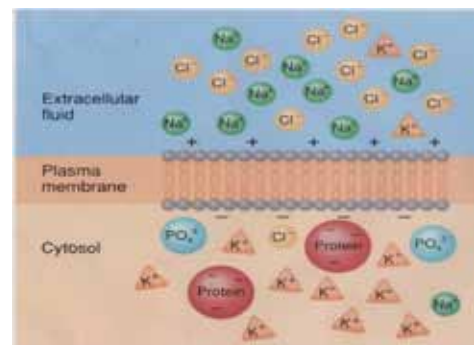
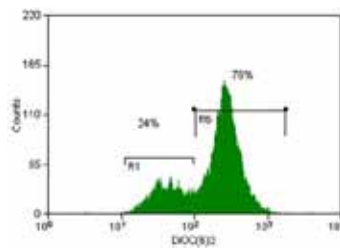
G2/G1 = 1.9625
% Tot = 75.661

APOPTOT. PEAK

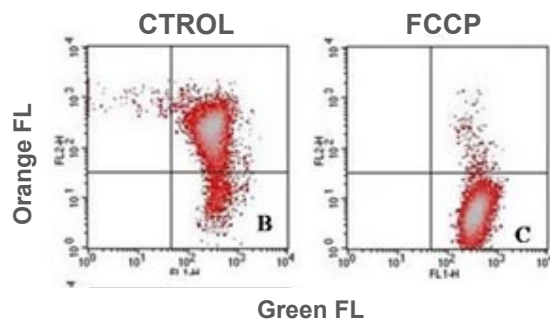
Mean = 45.454
CV = 16.076
% Tot = 24.335
D.L. = 0.599
% B.D. = 2.059
Ch.Sq. = 1.731
Cell No. = 12000

apoptosi: potencial de membrana

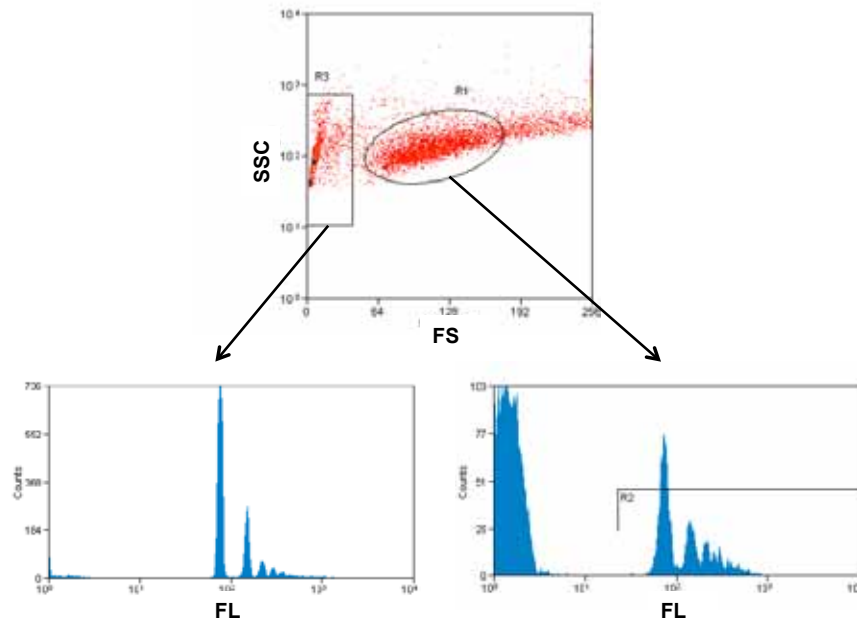
Rh123, DiOC, DiIC:



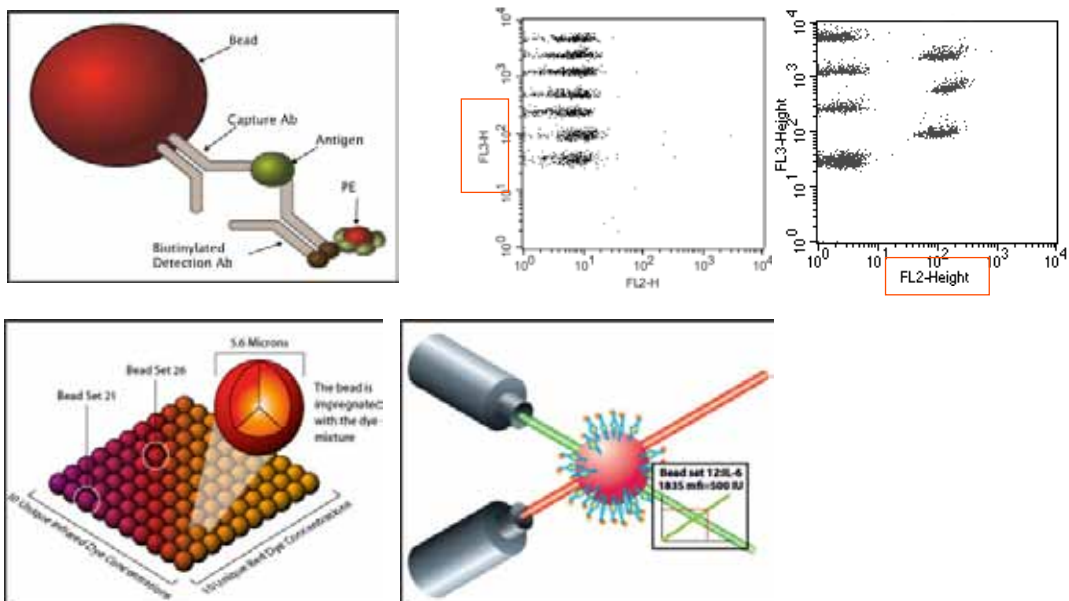
JC-1, JC-10:



■ fagocitosis

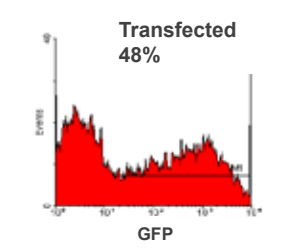
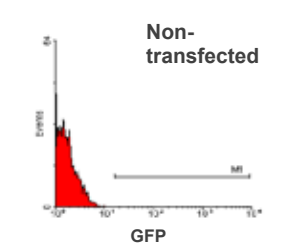
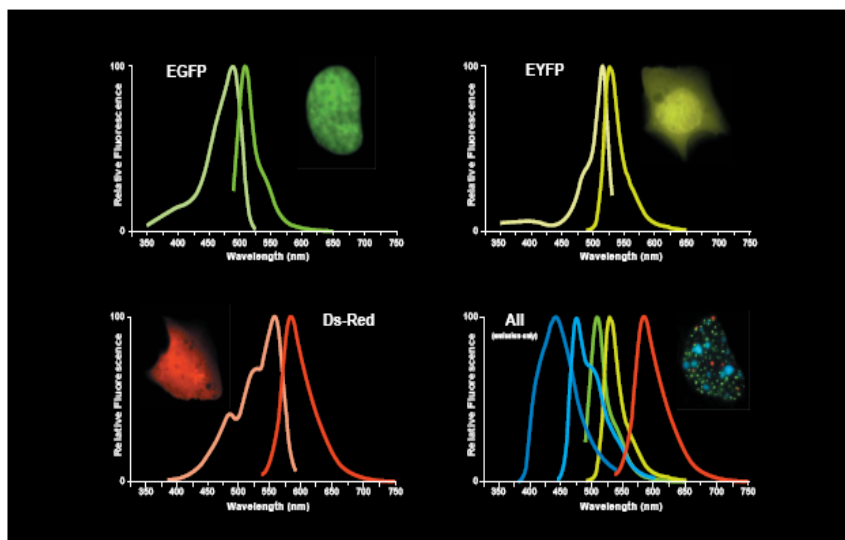


■ detecció d'antígens solubles i anàlisi multiplex



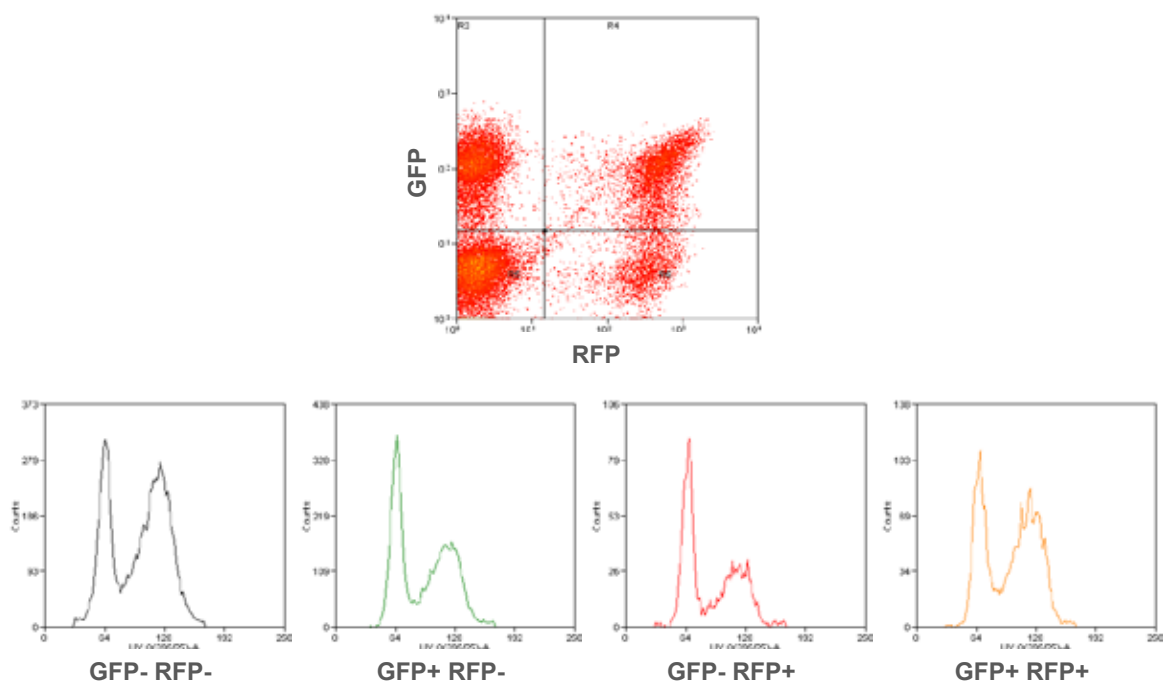
<http://www.oasiswebdevelopment.com>

■ Expressió gènica: proteïnes fluorescents



Fluorescence protein spectra. G Patterson et al. Journal of cell science, 114, 5. 2001

■ expressió de proteïnes fluorescents i correlació amb el cicle cel·lular



Citometria de flux:

- Alta velocitat d'anàlisi
- Informació de múltiples marcatges
- Automatització
- Purificació (“sorting”)