

CF_04- DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE DAÑOS EN EL ADN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Plataformas Científico-Tecnológicas: Laboratorios de Investigación

Plataforma de Citometría de Flujo

Técnico de área: Sara Moreno San Juan

www.ibsgranada.es



ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

CF_04- Determinación cualitativa y cuantitativa de daños en el ADN mediante Citometría de Flujo

1. Fundamentos del método y ventajas.

Se trata de una técnica de caracterización cualitativa y cuantitativa de daños en el ADN muy utilizada en estudio de radio y quimiosensibilizadores de agentes antitumorales genotóxicos en estudios de investigación oncológica básica. Se trata de un método fundamentado en la Citometría de Flujo (que puede complementarse mediante Microscopía Confocal) en el cual se estudia la activación por fosforilación en serina 139 de la histona H2AX (denominándose en este momento gamma-H2AX). Las roturas dobles de cadena causadas por errores en la replicación, por la activación de procesos de muerte celular por apoptosis, por radiación ionizante y agentes citotóxicos dirige a la fosforilación de dicha histona. La fosforilación se lleva a cabo por quinasas de la familia PI3-quininas como ATM, ATR y DNA-PKc. Esta activación sirve para señalar y localizar a los complejos de reparación que existe una lesión en el ADN que debe ser reparada con el objetivo de mantener la integridad genómica. El empleo de anticuerpos específicos frente a gamma-H2AX conjugados con fluorocromos permite la monitorización y cuantificación de los foci de reparación presentes en el núcleo de una célula dañada. Además, presentamos un panel para citometría de flujo que nos permite estudiar en qué fase del ciclo celular se producen o acumulan los daños en el ADN. Esta cartera de servicios tiene aplicabilidad en el estudio de potenciación de efectos citotóxicos de fármacos antitumorales en oncología básica, así como en el estudio de daños inducidos en el ADN por contaminantes ambientales.

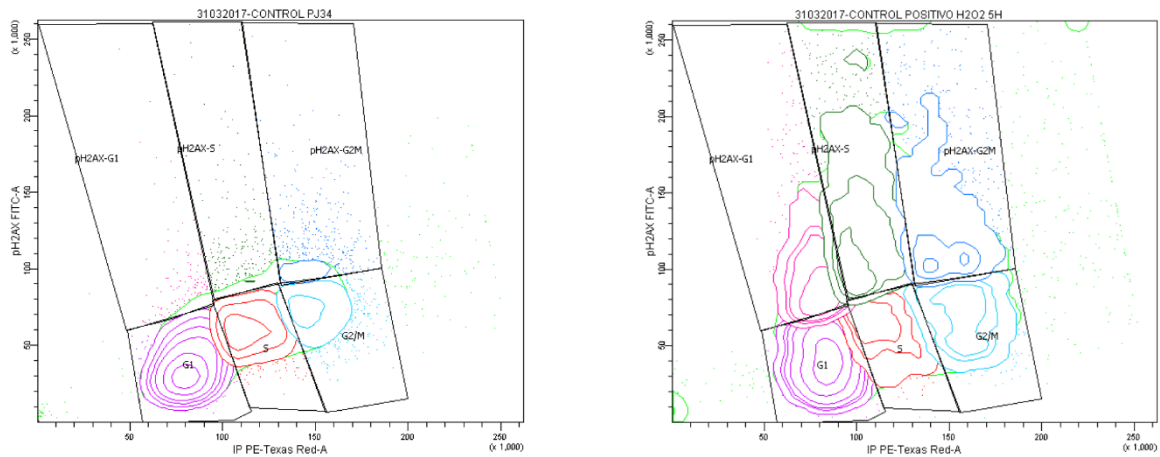


Figura 1. Determinación del daño en el ADN (γ -H2Ax) en función de la fase del ciclo celular mediante citometría de flujo. Figura cedida por José Antonio Muñoz-Gámez y Sandra María Martín Guerrero.

2. Descripción de los equipos ofertados y tipo de muestras analizadas.

a) Equipo de Citometría de Flujo y software:

- BD FACS Aria IIIu: citómetro de flujo analizador y separador celular. Número de láseres y detectores: 4 láseres. Láser violeta (405nm) y sus detectores (octágono con filtros 450-40, 510-50, 575-26, 610-20, 660/20, 710-50, 780-50); Láser azul (488nm) y sus detectores (SSC, FITC/Alexa488 y PerCP/PerCP-Cy5.5); Láser amarillo-verde (561nm) y sus detectores (PE, PE-Texas Red/IP/Living Colors/mCherry, PE-Cy7/PE-Cy5,5, PE-Cy7). Láser rojo (633 nm) y sus detectores (APC/Alexa 647, Alexa 700, APC-Cy7/APC-H7).
- Módulo BD FACS Aria Automated Cell Deposition Unit (ACDU) Field Upgrade (módulo de célula única), que permite separar poblaciones celulares de forma automática en placas de hasta 96 pocillos y en placas para microscopía de fluorescencia.
- Software de adquisición y análisis: FACSDiva 8.0.1.

b) Irradiador YXLON Maxishot E200. Sistema de irradiación de rayos-X.

c) Tipo de Muestra:

- Células en suspensión procedentes de tejidos y de líneas celulares.
- Especies: Humano, ratón, rata, primate, perro, felinos, equinos, porcinos (Según disponibilidad de los distribuidores de anticuerpos, puede que alguno de los marcadores descritos no esté disponible en todas las especies).
- Tamaño muestral: Por cada panel descrito a continuación, 5×10^5 células en 100 μ L de solución de ensayo o PBS.

3. Paneles Propuestos.

- **Panel gamma-H2AX-APC**
- **Panel gamma-H2AX-APC y ciclo celular mediante tinción con Yoduro de Propidio.**
- **Creación de paneles a la carta** (se ofrece el servicio de creación de nuevos paneles).

4. Servicios ofertados.

- **Irradiación de muestras.**
- **Procesado de muestras** (disgregación tejidos, tinciones, fijaciones, permeabilizaciones).
- **Adquisición de datos por el citómetro.**

5. Análisis de resultados.

Se describirá el número/porcentaje de células con daños en el ADN, intensidad del daño (RFU) y porcentaje de células dañadas en cada fase del ciclo celular.

6. Precios a convenir según paneles y anticuerpos seleccionados.

7. Contacto:

- **Técnico Responsable Plataforma de Citometría**
Sara Moreno San Juan
Mail: sara.moreno@ibsgranada.es
Teléfono: 958023494
- **Coordinadora Laboratorios de Investigación**
Dra. Paloma Muñoz de Rueda
Mail: palomalancha@ibsgranada.es
Teléfono: 958023980
- **Web:** <https://www.ibsgranada.es/plataformas/plataforma-de-citometria/>
- **Solicitud de recurso:** <https://www.ibsgranada.es/solicitud-de-recursos-de-la-unidad-cientifico-tecnica-de-laboratorios-de-investigacion/>
- **Tarifas:** <https://www.ibsgranada.es/wp-content/uploads/2020/11/Lista-de-Tarifas-UCT-Lab-Investigacion-2022-v02.pdf>

[1] Muñoz-Gamez, J.A.; Lopez Viota, J.; Barrientos, A.; Carazo, A.; Sanjuan-Nunez, L.; Quiles-Perez, R.; Muñoz-de-Rueda, P.; Delgado, A.; Ruiz-Extremera, A.; Salmeron, J., Synergistic cytotoxicity of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 and temozolomide in dual-drug targeted magnetic nanoparticles. *Liver Int*, **2015**, 35, (4), 1430-1441.