

CF_12 – ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$) POR CITOMETRÍA DE FLUJO (JC-1)

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_12 – Estudio de la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por Citometría de Flujo (JC-1)

1. Fundamentos del método y ventajas.

El rol que podría desempeñar la mitocondria en los diferentes procesos celulares, y en concreto en la **apoptosis** aún no se encuentra descrito en profundidad. De ahí el gran hincapié que se está haciendo en el desarrollo de nuevos protocolos o técnicas de análisis que permitan definirlo.

La apoptosis es un proceso complejo que puede ser inducido por una gran cantidad de factores, donde el papel de la mitocondria podría ser potencialmente variable y dependiente de otros factores como podría ser el modo de inducción de este proceso, el tipo celular, o el estado celular con respecto al ciclo celular, el estado de diferenciación, desarrollo y estado fisiológico normal o patológico.

Durante la apoptosis temprana se produce la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, lo que podría utilizarse como un marcador distintivo de este proceso. Esta pérdida de potencial es debida a la disrupción de la actividad mitocondrial, lo que incluye cambios en el potencial de membrana y alteraciones en el potencial de oxidación-reducción de la mitocondria. Por lo tanto, a partir de la cuantificación de la variación de la fluorescencia sería posible evaluar los cambios en el **potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)** y por ello la apoptosis. Este análisis es posible llevarlo a cabo utilizando técnicas como la citometría de flujo o la microscopía óptica confocal. Además, aportaría información sobre la salud mitocondrial, la abundancia y la localización (solo por microscopía, posibilidad de realizarlo en las Plataformas), tanto en procesos fisiológicos normales o permitiendo la monitorización de los efectos de algún compuesto farmacológico o como respuesta a una modificación genética.

Uso del marcador JC-1 como indicador del potencial de membrana mitocondrial

El marcador JC-1 es una sonda mitocondrial lipofílica con capacidad para atravesar las membranas lipídicas. Presenta una acumulación dependiente del potencial de membrana en las mitocondrias a bajas concentraciones internas o bajo potencial de membrana, de manera que se presenta como monómeros con una emisión de fluorescencia “verde) (aproximadamente 529 nm). A altas concentraciones o altos potenciales de membrana, JC-1 forma agregados, con una fluorescencia roja (aproximadamente: 590 nm). Por ello, en función de la ratio de intensidad de fluorescencia rojo/verde, puede determinarse si se ha producido un proceso de despolarización o descenso de la diferencia de potencial (incremento del fluorocromo en el medio celular, monómeros) o una hiperpolarización o aumento de la diferencia de potencial (entrada masiva del fluorocromo en la mitocondria, agregados) (**Figura 1**).

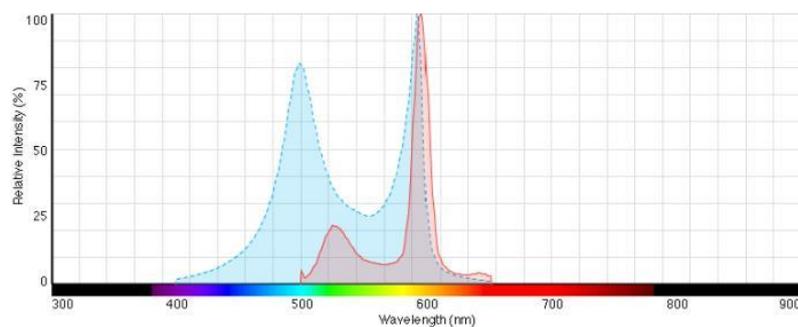


Figura 1. Espectros de excitación (azul) y emisión (rojo) de JC-1. Si JC-1 se encuentra formando agregados su emisión será a 590 nm, mientras que en estado monomérico emite a 514 nm.

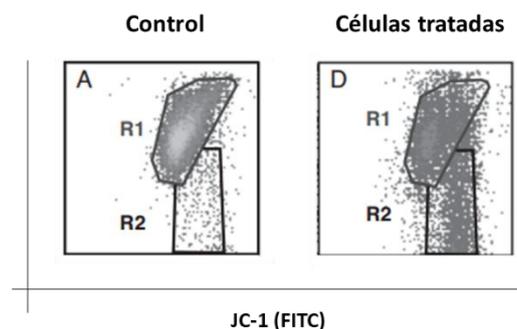


Figura 2: Dotplots representativos de células Jurkat en condiciones control (A) y después del tratamiento (D). Población de células vivas (R1) y población apoptótica (R2).

2. Procedimiento.

Esta cartera de servicios está orientada a la monitorización de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto del proceso de apoptosis celular en procesos fisiológicos normales o como respuesta a una modificación genética o tratamiento farmacológico.

3. Tipos de muestras válidas para el análisis.

Este análisis puede llevarse a cabo a partir de muestras celulares de cualquier tipo celular. Hay que tener en cuenta que, si se trata de células adherentes, es posible que durante el proceso de preparación de la muestra (tripsinización prolongada, disgregación mecánica o enzimática de los tejidos, etapas de centrifugación) se pierdan células apoptóticas por lo que será necesario recoger las células que se queden en el medio y no solo aquellas que están adheridas.

4. Equipos disponibles.

Este análisis puede llevarse a cabo a partir de muestras celulares de cualquier tipo celular. Hay que tener en cuenta que, si se trata de células adherentes, es posible que durante el proceso de preparación de la muestra (tripsinización prolongada, disgregación mecánica o enzimática de los tejidos, etapas de centrifugación) se pierdan células apoptóticas por lo que será necesario recoger las células que se queden en el medio y no solo aquellas que están adheridas.

- a. **BD FACS Aria IIIu:** citómetro de flujo analizador y separador celular.
 - 4 líneas láser: violeta (405nm), azul (488nm), amarilla-verde (561nm) y rojo (633 nm)
 - 16 detectores de fluorescencia: violeta (7 detectores), azul (2 detectores), amarilla-verde (4 detectores) y rojo (3 detectores).
 - Software de adquisición y análisis: FACSDiva 8.0.1.

- b. Cytex Northern Lights:** citómetro de flujo espectral.
 - 3 líneas láseres: violeta (405nm), azul (488nm) y rojo (637nm).
 - 38 detectores (16V, 14A y 8R). Capacidad para determinar hasta 38 fluorocromos de manera simultánea.
 - Rango de detección oscila entre los 420 y los 829nm.
 - Software de análisis y control del equipo: SpectroFlo
- c. BD FACS Melody:** citómetro de flujo analizador y separador celular.
 - 3 líneas láser: violeta (405nm), azul (488nm) y rojo (633 nm)
 - 9 detectores de fluorescencia.
 - Software de adquisición y análisis: FACS Chorus.

4. Contacto.

- **Técnico Especialista Responsable Plataforma de Citometría**
Dra. 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/TARIFAS-2024_v03.pdf