

MC_01- DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE DAÑOS EN EL ADN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Plataformas Científico-Tecnológicas: Laboratorios de Investigación

Plataforma de Microscopía Óptica e Imagen Celular

Técnico de área: Sara Moreno San Juan

www.ibsgranada.es



ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

MC_01- Determinación cualitativa y cuantitativa de daños en el ADN mediante Microscopía Confocal

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 Microscopía Confocal (que puede complementarse con la Citometría de Flujo, consultar cartera de servicio CF04) 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-quinasas 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.

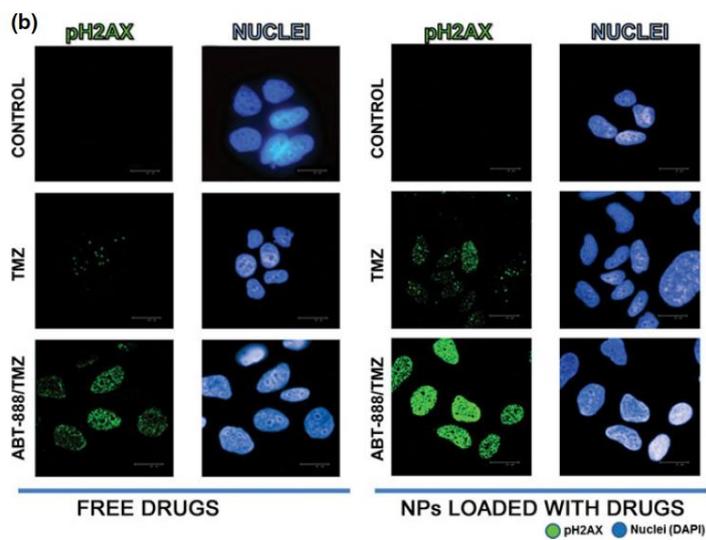


Figura 1. Imágenes de Microscopía Confocal de gamma-H2Ax. La inhibición de PARP-1 (ABT-888, proteína implicada en procesos de reparación de daños en el ADN), reduce la reparación de daños inducidos por Temozolomida (TMZ) y produce una acumulación de daños sin reparar. José Antonio Muñoz-Gómez y colaboradores, Liver International, 2015 [1].

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

- a) **Irradiador YXLON Maxishot E200.** Sistema de irradiación de rayos-X.
- b) Unidad de **Microscopía de Fluorescencia y Laser Confocal** constituida por los equipos: microscopio **LEICA DMR** (microscopio vertical de fluorescencia, campo claro), módulo detectores espectral **TCS-SP** (permite la detección simultánea de tres fluorocromos) y cámara detectora de fluorescencia y campo claro (Leica CD200); módulo de excitación láser Ar y HeNe (Líneas excitación: 458 nm, 488 nm, 543 nm, 633 nm) y dos ordenadores con las licencias del software de Leica que controla los equipos anteriormente citados.
- c) **Tipo de Muestra:**
 1. Células cultivadas de forma adherente sobre Chamber Slides.

3. Tinción para Microscopía Confocal propuesto.

- a) Gamma-H2AX-FITC, tinción nuclear con Yoduro de Propidio o Topro-3.

4. Servicios ofertados.

- a) **Irradiación de muestras.**
- b) **Procesado de muestras** (disgregación tejidos, tinciones, fijaciones, permeabilizaciones).
- c) **Adquisición de imágenes por Microscopía Confocal.**
- d) **Análisis de imágenes y preparación de estas para ser mostradas (artículos, pósteres, presentaciones, ...)** Descripción y análisis de la localización nuclear del daño y recuento del número de células con daños en el ADN así como el número de foci de reparación por célula analizada.

[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.

5. Contacto.

- **Técnico Responsable Plataforma de Microscopía Óptica e Imagen Celular**
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-microscopia-e-imagen-celular/>
- **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>