

SEPARACIÓN CELULAR EN HEMATOLOGÍA

Lourdes Cordón

Lab. de Citometría de Flujo, UDHEM

Unidad de Citómica, IIS La Fe

11 de noviembre de 2019

LaFe
Hospital
Universitari
i Politécnic



Instituto de
Investigación
Sanitaria LaFe



HematoLaFe

Unidad de
Citómica
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE

ciberonc
Centro de Investigación Biomédica en Red
Cáncer



Instituto de
Investigación
Sanitaria LaFe

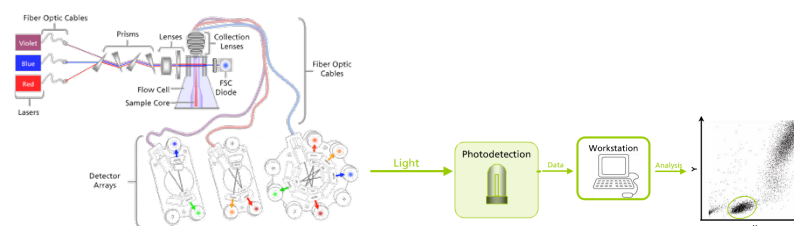
Índice

- **Separación celular**
- **Características del FACSAria-III**
- **Etapas de la separación**
 - **Etapas pre-separación**
 - **Etapas post-separación**
- **Aplicaciones en hematología**

- **Separación celular**
- Características del FACSAria-III
- Etapas de la separación
 - Etapa pre-separación
 - Etapa post-separación
- Aplicaciones en hematología

La separación celular o *cell sorting*:

- Obtención de muestras enriquecidas en un solo tipo celular previamente identificado y caracterizado mediante citometría de flujo

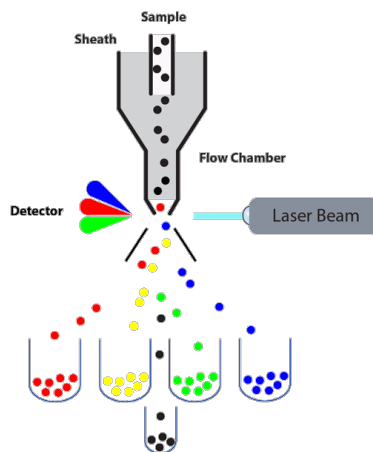


- Tecnología diseñada para aplicaciones que requieran alta pureza de recolección



Separación celular

- Selección de las células de interés mediante el programa de adquisición y redireccionamiento hacia un punto en el que se forman microgotas
- Cada microgota incluye una sola célula de interés y se carga electrostáticamente
- La corriente de microgotas pasa entre las placas deflectoras y las gotas cargadas son redirigidas en función de su carga hacia una cubeta de separación
- Cada cubeta de separación contendrá únicamente un tipo celular identificado y caracterizado previamente

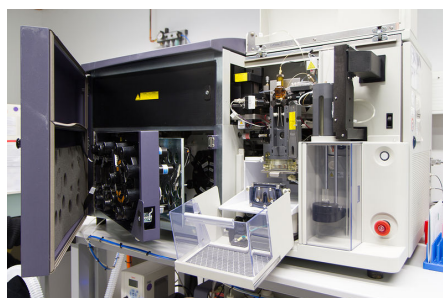
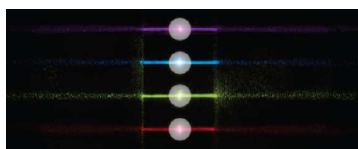


Índice

- Separación celular
- **Características del FACS Aria-III**
- Etapas de la separación
 - Etapa pre-separación
 - Etapa post-separación
- Aplicaciones en hematología

Características del FACS Aria-III

- ✦ 14 parámetros analizables
- near-UV (375 nm)
- azul (488 nm)
- yellow-green (561 nm)
- rojo (633 nm)



Características del FACS Aria-III

✦ Boquillas (*nozzles*):

- 70 μm
- 85 μm
- 100 μm
- 130 μm

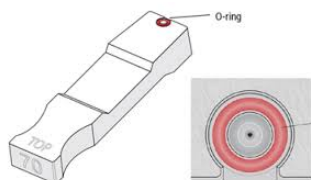
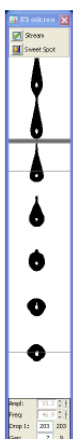
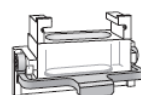


Table 4-1 Examples of breakoff patterns at each nozzle size

70 micron	85 micron	100 micron	130 micron
			

Características del FACSAria-III

- ✦ Separación ≤ 4 tipos celulares
- ✦ Diferentes soportes para separación
- ✦ Elevada velocidad de separación
- ✦ Sistema de control de temperatura
- ✦ Automated Cell Deposition Unit (ACDU): placa o porta



Universal top (front view)



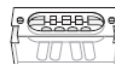
Universal top (back view)



Four-way 1-mL
(optional)



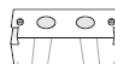
Four-way 12 x 75-mm



Four-way 1.5-mL
Eppendorf



Two-way 12 x 75-mm



Two-way 15-mL

Índice

- Separación celular
- Características del FACSAria-III
- Etapas de la separación
 - Etapa pre-separación
 - Etapa post-separación
- Aplicaciones en hematología

Etapas de la separación

Pre-separación:

1. Diseño y procedimiento experimental: consideraciones
2. Control de la linealidad del *sorter*
3. Ajuste de la corriente (*stream*) de microgotas y cálculo de parámetros
4. Creación de plantilla de trabajo
5. Calibración específica: controles + muestra
6. Adquisición pre-sort: controles y muestra
7. Establecimiento de la estrategia de separación

Post-separación:

8. Separación celular
9. Adquisición post-sort: pureza

Etapas pre-separación

Consideraciones en el diseño y procedimiento experimental:

- Calidad de las muestras, viabilidad
- Preservación y nutrición celular: FBS
- Tipo y tamaño celular (μm) $\times 3 = \text{nozzle}$
- Despegar las células: tripsina o accutasa
- Filtración (30-100 μm), DNAsa: disminución de agregados
- Lavados: concentración**, eliminación medio
- Tubos: polipropileno menos adherente
- Resuspensión: PBS o HBSS con BSA (evita adhesión) y FBS (neutraliza tripsina, aunque interfiere en readhesión)
- Temperatura: si es posible a 4°C (mantener en frío)
- Separación aséptica

Etapa pre-separación

Consideraciones en el diseño y procedimiento experimental:

Número de células:

- Pérdida celular: procesamiento, adquisición previa, conflictos
- Determinación del número de células de partida:
 - células a separar ÷ (frecuencia de células × eficiencia)

Por ejemplo:

Objetivo: separar 60.000 células de interés (frecuencia 1%)

Eficiencia = 90%

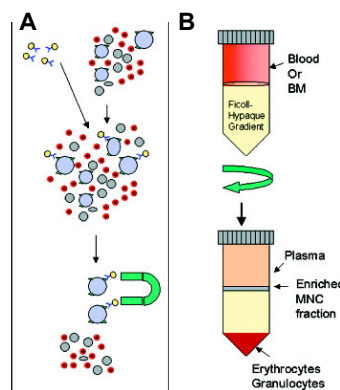
Número de células de partida = $6,66 \times 10^6$ células

- Cálculo de la eficiencia de la separación:
 - realizar análisis previo (7-AAD, PI, DAPI)
 - asumir eficiencia = 50%

Etapa pre-separación

Consideraciones en el diseño y procedimiento experimental:

- Pre-enriquecimiento inmunomagnético
 - aumenta % células de interés
 - mejora eficiencia
 - disminuye tiempo de separación
- Pre-enriquecimiento por gradiente de centrifugación



Etapa pre-separación

Tipos de controles empleados:

CONTROL	TIPO DE CÉLULAS	RAZÓN
Autofluorescencia	Sin marcar (tratadas y no tratadas)	Control negativo, ruido de fondo, autofluorescencia
Isotípico	Marcadas con Igs inespecíficas	Control inespecificidad de unión a otras proteínas
<i>Single stain</i>	Marcadas con un único fluorocromo	Control positivo calibración
<i>Fluorescence minus one</i> (FMO)	Marcadas con todos los fluorocromos excepto uno	Control positivo calibración
Internos	Normales de la propia muestra	Control de la positividad de las células de interés con respecto a células normales
Viabilidad	Marcadas con IP, 7-AAD, DRAQ5	Control del número de células vivas y muertas en la muestra

Etapa post-separación

Separación celular:

- Medio de deposición:
 - cultivo: PBS o HEPES suplementado con BSA (10-50%)
 - secuenciación: PBS
 - criopreservación: PBS con 10% DMSO y 20% FBS
 - metabolómica: medio sin BSA
 - NO medios carbonatados (alcalinización, muerte celular)
- Tipo de tubo, placa o porta
- Recubrimiento de soportes con 4% BSA (mejora la recuperación)
- Centrifugación: posibilidad de pellet poco visible

Etapa post-separación

Separación celular:

- Modos de separación:
 - rendimiento
 - pureza
 - célula única (*single cell*)
- Velocidad de separación:
 - frecuencia de células baja → menor velocidad
 - menor velocidad → aumenta pureza

Etapa post-separación

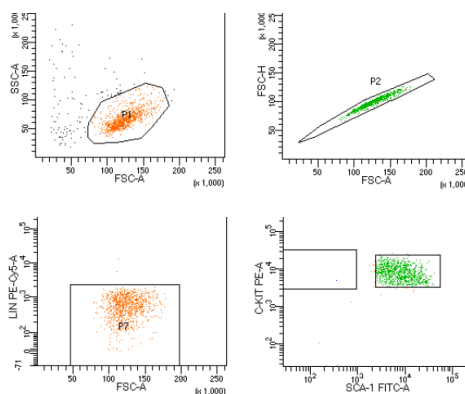
Adquisición post-separación:

- Comprobación de la pureza
- Viabilidad celular

Tube: POST SORT CONTROL SAMPLE

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	1,156	###	100.0
■ P1	966	83.6	83.6
■ P2	960	99.4	83.0
■ P7	958	99.8	82.9
■	937	97.8	81.1
■	1	0.1	0.1

Pureza células de interés: 81%
Flow rate: 2.0 → 4.500 células/s
Eficiencia: 68%





- Separación celular
- Características del FACS Aria-III
- Etapas de la separación
 - Etapa pre-separación
 - Etapa post-separación
- Aplicaciones en hematología



Purificación de poblaciones minoritarias

- células neoplásicas residuales (ERM)
- células troncales leucémicas (LSC)
- clones HPN

Identificación: paneles AcMos

Destino

- extracción ác. nucleicos: PCR, secuenciación (10^5 – 5×10^5 células)
- criopreservación (Biobanco) (10^6 células/criotubo)

Proposed leukemia stem cell marker	Reference
CD34+CD38 ⁻	Lapidot et al. 1994[35] Bonnet et al. 1997[36]
CD34+CD38 ⁻ CD90 ⁻	Blair et al. 1997[37]
CD34+CD38 ⁻ CD71 ⁻ HLA-DR ⁻	Blair et al. 1998[38]
CD34+CD38 ⁻ CD123 ⁺	Jordan et al. 2000[40]
CD34+CD38 ⁻ CD44 ⁺	Jim et al. 2006[44]
CD34+CD38 ⁻ CD96 ⁺	Hosen et al. 2007[45]
CD34+CD38 ⁻ CLL-1 ⁺ , or SP CLL-1 ⁺	Van Rhenen et al. 2007[46] Moshaver et al. 2008[16]
Lin ⁻ CD34+CD38 ⁻ CD90 ⁻	Wang et al. 2005[50] Majeti et al. PNAS 2007[33]
Lin ⁻ CD34+CD38 ⁻ CD90 ⁻ CD47 ⁺	Majeti et al. 2009[51]

Aislamiento de células para cocultivo

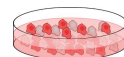
- células troncales mesenquimales humanas (hMSCs)

Identificación:

FITC	PE	PerCP	APC
CD90	CD105	HLADR	CD73
CD45	CD34	CD19	CD14

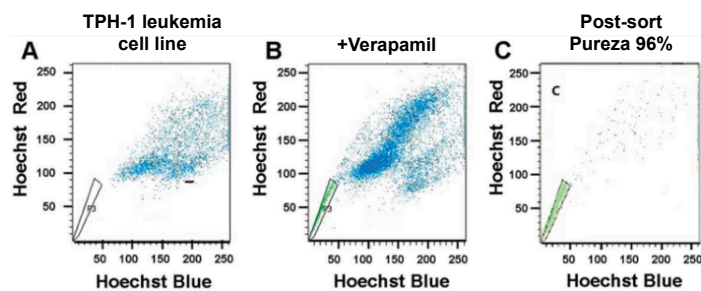
Destino:

- cocultivo con otros tipos celulares



Separación de *side population*

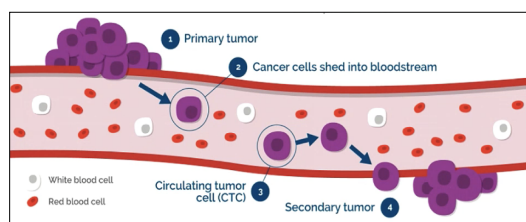
Identificación: Hoechst Blue / Hoechst Red





Aislamiento de células tumorales circulantes (CTCs)

- elevado volumen de la muestra de partida (1-100 células / mL SP)
- concentración mediante *bulk lysis*
- no soluciones hemolizantes con PFA



Biopsia líquida:

- Marcador pronóstico
- Monitorización
- Eficacia tratamiento



GENOMIC ANALYSIS



IN VITRO CULTURE
AND LIVE CELL ASSAYS



CELL STAINING AND
ENUMERATION

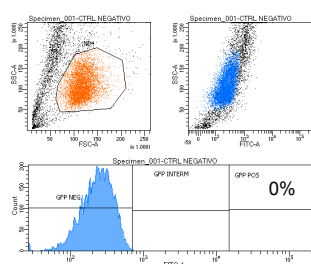


PROTEOMICS AND
SIGNALING PATHWAYS

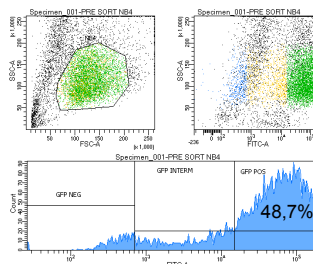


Estudios de expansión clonal: separación célula única

- células transfectadas con lentivirus + reporter (GFP, RFP)
- crecimiento de colonias a partir de un único clon



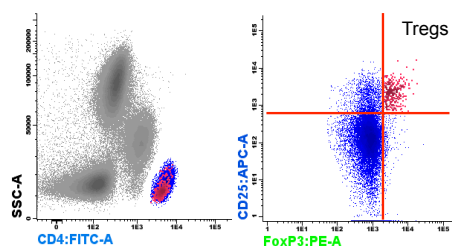
Tube: CTRL NEGATIVE			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	10,000	###	100.0
■ NB4	6,585	65.8	65.8
■ SINGLETES	6,585	100.0	65.8
■ GFP NEG	6,575	99.8	65.8
■ GFP POS	0	0.0	0.0
■ GFP INTERM	10	0.2	0.1



Tube: PRE SORT NB4			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	10,000	###	100.0
■ NB4	6,263	62.6	62.6
■ SINGLETES	6,259	99.9	62.6
■ GFP NEG	407	6.5	4.1
■ GFP POS	4,869	77.8	48.7
■ GFP INTERM	983	15.7	9.8

Aislamiento de células inmunes funcionales

- Tregs: CD4⁺ CD25⁺high nuFoxP3⁺



Supresión inmunidad tumoral
↑ mal pronóstico

Inactivadas: CD45RA⁺
Activadas (inducibles): CD45RA⁻

- Terapia celular *in vitro*

Creación de colecciones de células

- elevada pureza y rendimiento
- varios tipos celulares a partir de la misma muestra
- aproximación lenta si frecuencia de la población es baja

Pureza de diferentes poblaciones leucocitarias a partir de SP de individuos sanos

Sorting technology	Neutrophils	Monocytes	B cells	CD4 ⁺ T cells	CD8 ⁺ T cells
FACS	–	99.1±1.1 (87.1–100)	95.2±5.5 (70.1–99.9)	99.1±1.6 (76.9–100)	99.1±1.1 (92.9–100)

Results expressed as mean percentage of cells from the whole fraction of sorted/purified cells ± 1 SD (range).

Criopreservación en Biobanco

- clonación
- análisis por PCR
- sobreexpresión génica (estudios funcionales)

Almeida M *et al.*, Pathobiology, 2014

SEPARACIÓN CELULAR EN HEMATOLOGÍA

CONTACTO:

Lourdes Cerdón, PhD
Grupo de Investigación en Hematología · IIS La Fe
Unidad de Citómica · IIS La Fe

David Mesado, TEL
Unidad de Citómica · IIS La Fe
cytomics@iislafe.es
961246716 ext: 246716



@CytomicsIISLaFe

LaFe
Hospital
Universitari
i Politècnic



Instituto de
Investigación
Sanitaria LaFe



HematoLaFe

Unidad de
Citómica
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE

ciberonc
Centro de Investigación Biomédica en Red
Cáncer