

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA**EL SECRETARIADO DE INFRAESTRUCTURA CIENTÍFICA Y DESARROLLO TECNOLÓGICO****INFORMA****AMPLIACIÓN Y MEJORA DE UN CITÓMETRO ANALIZADOR DE IMAGEN
IMAGESTREAM-X MARK II.**

El Grupo de Investigación Biología y Comunicación Celular ha incorporado en las dependencias del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria un sistema de **“AMPLIACIÓN Y MEJORA DE UN CITÓMETRO ANALIZADOR DE IMAGEN IMAGESTREAM-X MARK II”** con cargo al proyecto **EQC2019-006152-P** concedido por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de las Ayudas para la Adquisición de Equipamiento Científico-Técnico correspondientes al Subprograma Estatal de Infraestructuras de Investigación y Equipamiento Científico-Técnico (Plan Estatal I+D+i 2017-2020) (convocatoria 2019), cofinanciado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y la Junta de Extremadura, cuyo Responsable Científico es el investigador **José Antonio Tapia García**.

OBJETIVO Y FUNCIONALIDAD DEL EQUIPAMIENTO ADQUIRIDO

Proyecto EQC2019-006152-P: Ampliación y mejora de un Citómetro Analizador de Imagen ImageStreamX Mark II.

Características del equipamiento adquirido

No se ha adquirido un equipo completo. Con este proyecto se ha mejorado un citómetro analizador de Imagen preexistente, modelo *Amnis ImageStreamX Mark II* (ISX MII).

Este equipo se distingue de otros citómetros de flujo en que sustituye los fotomultiplicadores de los equipos tradicionales por un elemento generador de imagen de tipo CCD lo que permite obtener hasta 12 imágenes de cada una de las células analizadas, incluyendo imágenes en campo oscuro (mediante dispersión de luz lateral), luz transmitida (campo claro), y hasta 10 imágenes de fluorescencia.

Este equipo opera con un tamaño de píxel de 0.3 micras (magnificación 60×) que permite la visualización de la fluorescencia de la membrana, citoplasma, o núcleo, a la vez que se caracteriza la intensidad de fluorescencia de cada célula con relación a cada fluoróforo. El modo de trabajo es equivalente al de un citómetro de flujo convencional, en el cual una suspensión celular se orienta mediante enfoque hidrodinámico sobre el punto de análisis, de modo que cada célula es observada y valorada individualmente a una velocidad que oscila entre 300 y 4000 células por segundo.

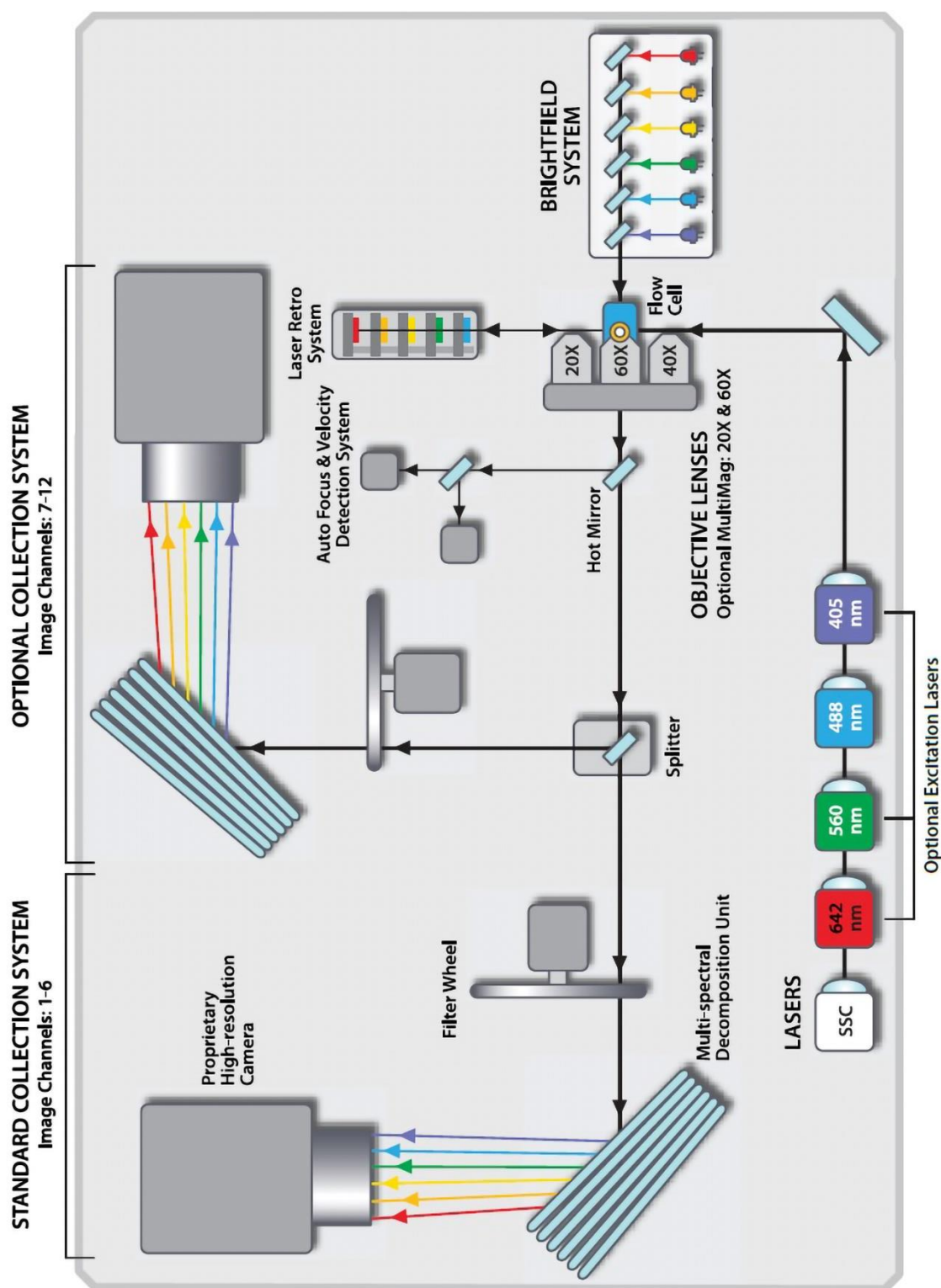
Después de la actualización el ISX MII disponible en la UEx está equipado con 4 láseres de excitación de fluorescencia (405nm, 488nm, 561 nm y 642nm) que trabajan en modo co-lineal. Los 12 canales CCD de los que dispone el equipo tras la actualización están asignados del siguiente modo:

- 1 o 2 canales dedicados a campo claro (BrightField)
- 1 canal dedicado a campo oscuro (SSC) (DarkField)
- 9 o 10 canales para fluorescencia

Todas las especificaciones técnicas son detalladas a continuación:

Sistemas de Iluminación		
Láser de dispersión lateral	785 nm	
Láser Azul	488 nm	
Láser Violeta	405 nm	
Láser Verde	561 nm ADQUIRIDO EN ESTE PROYECTO	
Láser Rojo	642 nm	
Canales de detección (12)		
SISTEMA DE ADQUISICIÓN 1 (Canales 1-6)	CANAL 01 420-480 nm	Campo claro (FSC)
	CANAL 02 480-560 nm	
	CANAL 03 560-595 nm	
	CANAL 04 595-642 nm	
	CANAL 05 642-745 nm	
	CANAL 06 745-800 nm	Campo oscuro (SSC)
SISTEMA DE ADQUISICIÓN 2 (Canales 7-12) ADQUIRIDO EN ESTE PROYECTO	CANAL 07 430-505 nm	
	CANAL 08 505-570nm	
	CANAL 09 570-595 nm	
	CANAL 10 595-642 nm	
	CANAL 11 642-745 nm	
	CANAL 12 748-800 nm	Campo oscuro (SSC)
Límite de detección en Fluorescencia		
< 50MESF		
Apertura Numérica		
0.9		
Tamaño de Píxel		
60x	0.3 x 0.3 μm	
Ancho de Campo		
60x	40 x 170 μm	
Análisis de Datos, Software IDEAS		
Compensación de Fluorescencias	Automática en tiempo real y post-adquisición	
Manejo de Muestra		
Toma de muestra, vaciado, limpieza y purgados automáticos.		
Enfoque y tracking automáticos.		
Esterilización automática.		
Calibración y control de calidad automático.		
Alineado de láser automático.		

Tabla con las especificaciones técnicas del equipo (incluyendo la configuración previa y las actualizaciones obtenidas con el proyecto, estas últimas en color rojo)



Esquema con las especificaciones técnicas del equipo (incluyendo las actualizaciones obtenidas con el proyecto)



Fotografías del equipo Amnis ImageStreamX Mark II disponible en la UEx

- A) Vista general del equipo en su ubicación en la facultad de veterinaria.
- B) Detalle de uno de los ordenadores de control de equipo.
- C) Detalle del número de inventario (corresponde con su adquisición en 2015)
- D) Detalle del segundo ordenador de control del equipo.

Valor añadido e impacto científico-tecnológico de la adquisición

Actualmente la detección y análisis experimental de gran cantidad de procesos celulares se fundamentan en el marcaje de diversas estructuras y organelas intracelulares y/o extracelulares con compuestos de naturaleza fluorescente. La detección de estos fluoróforos permite determinar en la célula eventos tan dispares como procesos de señalización intracelular (movimientos iónicos, concentración de nucleótidos,...), identificación y caracterización de estructuras (proteínas intra- y transcelulares, organelas...), colocalización proteica, morfología celular, estado metabólico, fenotipado celular inmunológico, viabilidad celular y autofagia, contenido genómico, daño genómico, respuesta a estrés de diversos orígenes, activación de fenómenos de supervivencia y muerte celular, interacciones celulares, análisis de ciclo celular y mitosis, etc.

Algunas de estas técnicas están enormemente facilitadas por el empleo de la citometría de flujo, que permite analizar de forma rápida y precisa gran cantidad de células y caracterizar el estado de las poblaciones y subpoblaciones celulares considerando diversos parámetros en función de los fluoróforos empleados. A pesar de sus ventajas, una de las limitaciones de estas técnicas radica en que no se dispone de información acerca de la localización subcelular del fluoróforo(s) testado ni de sus interacciones cuando se utiliza más de más de uno.

En otras situaciones las técnicas de elección para caracterizar distintos parámetros biológicos utilizando fluoróforos implican la utilización de microscopía de fluorescencia (clásica o confocal), mediante aproximaciones que permiten obtener información precisa de localización subcelular de los fluoróforos testados y sus interacciones. En este caso la limitación está representada por el escaso número de eventos que se pueden analizar, en comparación con la citometría de flujo, y la lentitud del análisis en la mayoría de las situaciones experimentales.

Mediante la citometría de flujo con análisis de imagen se puede asociar ambas técnicas, permitiendo combinar la rapidez y cantidad de eventos analizados mediante citometría de flujo, con la determinación subcelular en cada una de las subpoblaciones de los fluoróforos empleados y sus interacciones mediante el análisis de imágenes, tal y como se desarrolla mediante microscopía de fluorescencia.

Técnicas o investigaciones que el equipo permitirá desarrollar o abordar

Las ventajas que ofrece el equipo son muchas, con características y versatilidad muy superiores a la citometría o microscopía convencionales. Aunque existen muchas otras, a continuación indicamos algunas aplicaciones que se podrían utilizar de forma inmediata, todas ellas determinables mediante este sistema en poblaciones y subpoblaciones celulares con determinadas características funcionales:

- localización subcelular de estructuras
- colocalización intracelular de proteínas
- translocación de proteínas
- organización del citoesqueleto
- interacciones célula a célula
- internalización y fagocitosis
- morfología celular
- quimiotaxis
- muerte celular y autofagia
- análisis de telómeros
- análisis de ciclo celular y mitosis
- presencia intracelular de parásitos
- presencia intracelular de bacterias
- ...

Equipo responsable y potencial de utilización por parte de otros grupos de investigación

El citómetro *ImageStreamX Mark II* de la UEx está localizado en el laboratorio *in vitro* del Grupo de Investigación BIOLOGÍA Y COMUNICACIÓN CELULAR (BICOMCEL), localizado en el Edificio de Departamentos de la Facultad de Veterinaria.

El investigador responsable del equipo se ocupa de establecer un cronograma para evitar el solapamiento en la adquisición y análisis de datos y un control por escrito del uso del equipo donde cada investigador que lo utilice debe indicar (1) el grupo al que pertenece, (2) el tiempo de uso de cada experimento y (3) las condiciones experimentales empleadas.

Para garantizar el buen funcionamiento de la unidad es necesario realizar un **curso de formación impartido por el fabricante**, tras lo que se facilita el acceso al equipo a los investigadores interesados.

El curso requerido informa sobre la adquisición de muestras y sobre los procedimientos relacionados con los análisis posteriores a la adquisición para cuantificar los parámetros de interés (colocalización, translocación,...).

Respecto a la **adquisición de las muestras**, el equipo es de utilización intuitiva y sencilla e incorpora los mecanismos necesarios para realizar automáticamente las siguientes rutinas de trabajo:

- aspirado de muestra
- limpieza y purgado del circuito
- ajuste del foco y monitorización continua del flujo
- autocalibración
- control de calidad
- alineado de láser
- esterilización
- apagado

Respecto al **análisis de los resultados**, el software de análisis es libre y puede ser instalado en cualquier equipo, por lo que los investigadores pueden analizar las muestras adquiridas de forma independiente.

El investigador responsable del equipo ha puesto a disposición de los usuarios un **procedimiento de especificaciones técnicas y manual de uso** que es entregado a todos los investigadores que hacen uso del equipo. En este manual se describen las especificaciones y el manejo general del equipo. Los usuarios deben seguir estrictamente los procedimientos de uso descritos en este manual.

Finalmente, las condiciones de uso prevén que los gastos comunes del equipo (incluyendo las revisiones periódicas y posibles reparaciones) serán abonadas por los responsables de los grupos de investigación proporcionalmente a la intensidad de uso del equipo por parte de los investigadores de su grupo. Los gastos específicos de cada experimento (sondas fluorescentes, y obtención, tratamiento y preparación de las muestras), corren a cargo del investigador principal del proyecto para el que se realiza el experimento.

Producción Científica

Ortiz-Rodríguez JM, Martín-Cano FE, Gaitskell-Phillips G, Silva A, Tapia JA, Gil MC, Redondo E, Masot J, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. The SLC7A11: sperm mitochondrial function and non-canonical glutamate metabolism. *Reproduction*. 2020 Dec;160(6):803-818. doi: 10.1530/REP-20-0181. PMID: 33112766.

Ortiz-Rodríguez JM, Martín-Cano FE, Ortega-Ferrusola C, Masot J, Redondo E, Gázquez A, Gil MC, Aparicio IM, Rojo-Domínguez P, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. The incorporation of cystine by the soluble carrier family 7 member 11 (SLC7A11) is a component of the redox regulatory mechanism in stallion spermatozoa†. *Biol Reprod*. 2019 Jul 1;101(1):208-222. doi: 10.1093/biolre/ioz069. PMID: 30998234.

Ortega-Ferrusola C, Martín Muñoz P, Ortiz-Rodríguez JM, Anel-López L, Balao da Silva C, Álvarez M, de Paz P, Tapia JA, Anel L, Silva-Rodríguez A, Aitken RJ, Gil MC, Gibb Z, Peña FJ. Depletion of thiols leads to redox deregulation, production of 4-hydroxynonenal and sperm senescence: a possible role for GSH regulation in spermatozoa†. *Biol Reprod*. 2019 Apr 1;100(4):1090-1107. doi: 10.1093/biolre/ioy241. PMID: 30418487.

Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, Gallardo-Soler A, Campo ML, Salido GM, Pariente JA, Peña FJ, Tapia JA. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Rep*. 2016 Sep 16;6:33647. doi: 10.1038/srep33647. PMID: 27633131; PMCID: PMC5025659.