

SEPARACIÓN DE CÉLULAS

Muchos de los avances en biología celular y molecular son el resultado de **estudios llevados a cabo en células especializadas**. Como los tejidos y órganos que componen un ser vivo están formados por múltiples tipos celulares, una de las primeras tareas a las que se enfrenta el investigador consiste en **aislar una población pura de un determinado tipo de células**. Además, tras la separación, se tendrán que utilizar otro tipo de técnicas para **contar** el número de células obtenidas y para **determinar su viabilidad**, es decir, para comprobar que siguen vivas.

Las diversas técnicas de separación se basan en las diferencias existentes entre los distintos tipos celulares como, por ejemplo:

- el **tamaño** y la **densidad** de las células
- la afinidad de **anticuerpos** hacia determinados epítomos de la superficie celular
- la **dispersión** de luz
- la emisión de **fluorescencia**

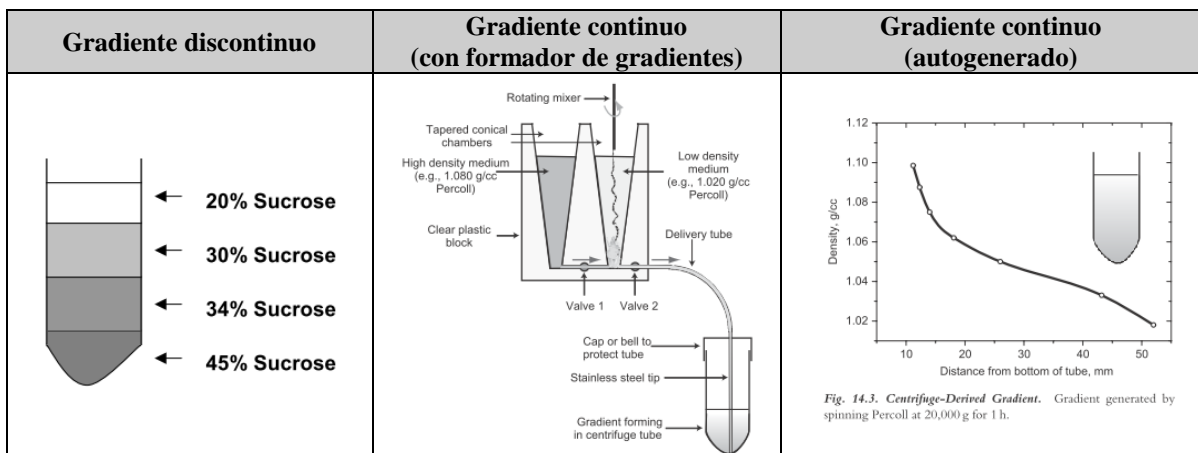
Con frecuencia, para conseguir una separación eficaz es necesario utilizar dos o más métodos.

SEDIMENTACIÓN ISOPÍCNICA

Esta técnica permite separar células **en función de su densidad**. Este método es ideal para separar células cuyas densidades difieren en más de 0,02 g/ml. Para ello **se utilizan centrifugadoras convencionales** y se aplican campos gravitatorios de baja intensidad (**pocas g**). La separación se consigue haciendo sedimentar las células en un **gradiente de densidad**, es decir, en un medio cuya densidad aumenta con la profundidad del tubo.

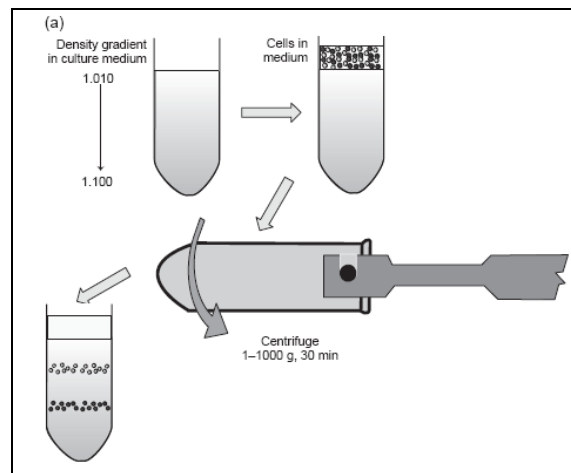
Se distinguen **dos tipos de gradiente de densidad**:

- Gradiente **discontinuo**: se genera superponiendo capas de densidad decreciente
- Gradiente **continuo**: se genera con un formador de gradientes o, en algunos casos, se generan ellos solos al centrifugarlos a velocidades elevadas

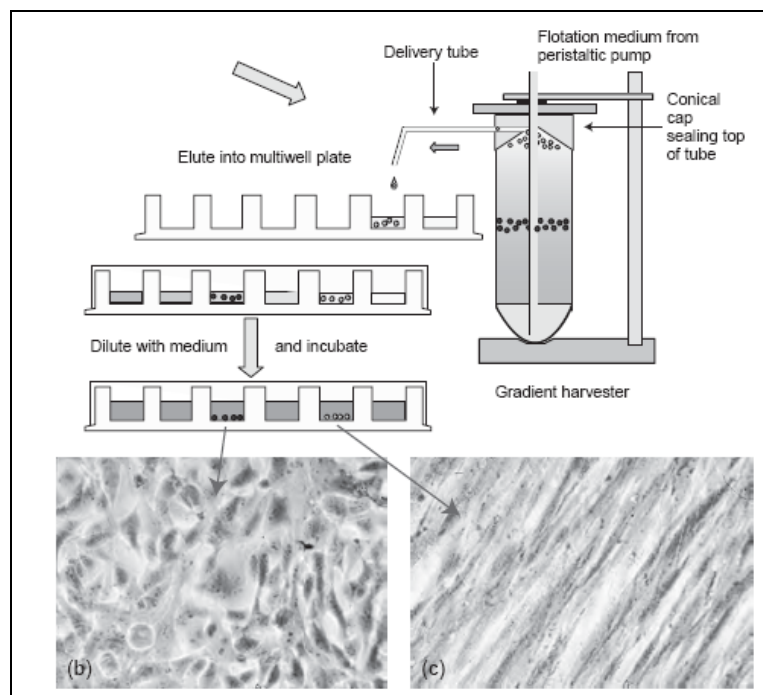


El medio con el que se forma el gradiente de densidad debe ser **muy soluble en agua** para poder abarcar un amplio rango de densidades. Además, debe ser **inerte**, **no debe ser tóxico**, no debe ser viscoso a concentraciones elevadas y **no debe ejercer mucha presión osmótica** en disolución. Ejemplos de este tipo de medios son la sacarosa, el cloruro de cesio, metrizamida y polímeros de elevado peso molecular como los dextranos, el Ficoll o el Percoll, etc.

En un gradiente de densidad, las células sedimentan hasta alcanzar aquella posición en la que su densidad iguala a la del medio.



Una vez separadas, hay que **extraer las células del gradiente** de densidad. Una forma de hacerlo es introducir un medio de flotación (muy denso) directamente en el fondo del tubo para que vaya desplazando el gradiente y las células hacia arriba. Las células son canalizadas hacia el tubo de salida y se recogen en una placa con múltiples pocillos que ya tienen medio de cultivo. Las células diluidas ya separadas se cultivan hasta alcanzar el número deseado para realizar los experimentos planeados.

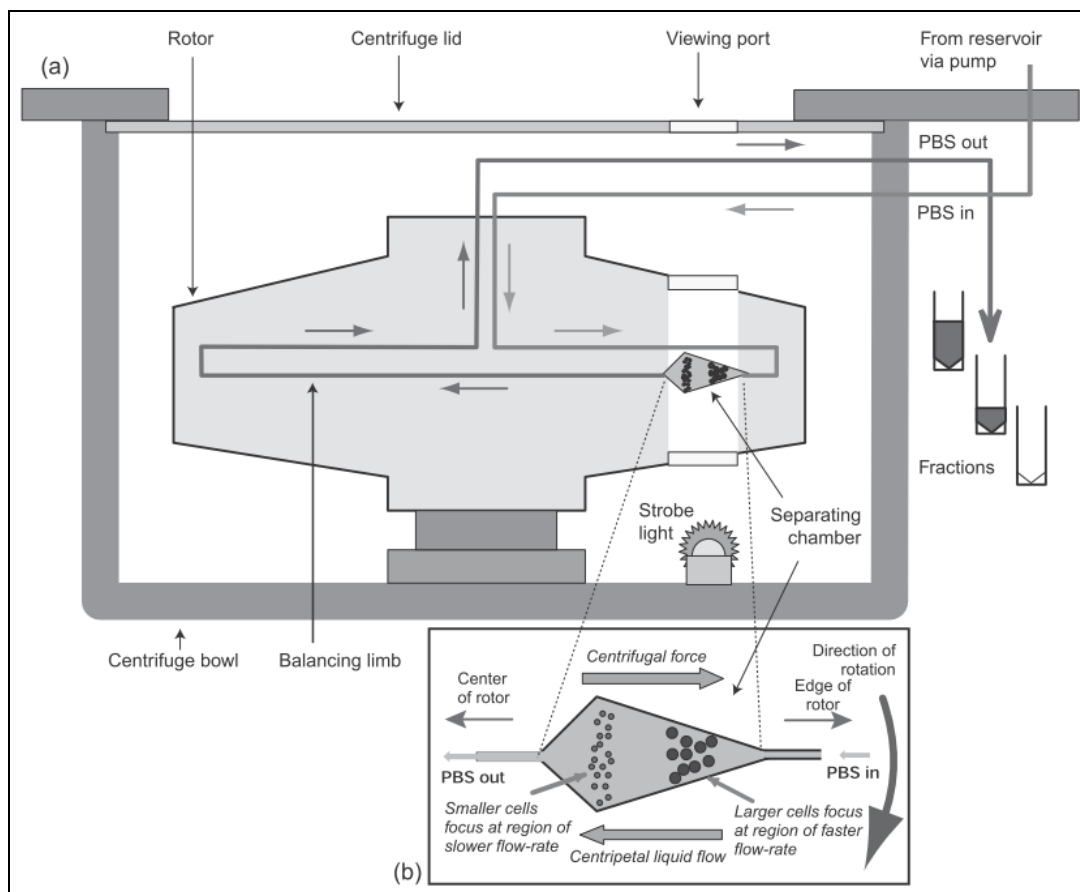


ELUTRIACIÓN CENTRÍFUGA

Este método separa las células **en función de su tamaño**. El **elutriador** consiste en una centrifugadora adaptada para utilizar un rotor especialmente diseñado para la separación de células.

El proceso comienza cuando las células, que están suspendidas en el medio de cultivo, son bombeadas hasta la **cámara de separación**, localizada en el interior del rotor, mientras éste está girando. El **diseño de la cámara** también ayuda a la separación porque, al ser más estrecha en el extremo más alejado del eje del rotor, el flujo del medio es más rápido en esa zona y genera una fuerza centrípeta más intensa. Una vez en el interior de la cámara, se establece un equilibrio de fuerzas. Por un lado, la **fuerza centrífuga** tiende a empujar las células hacia las paredes del rotor. Por otro lado, el bombeo de medio de cultivo a través de la cámara establece una **fuerza centrípeta** de intensidad variable que contrarresta la velocidad de sedimentación de las células.

Si la población celular fuese uniforme se alcanzaría una **situación de equilibrio** en la que las células permanecerían en una **posición fija**. Como hay varios tipos celulares con distinto tamaño y densidad, las células tienden a sedimentar a distintas velocidades, y cada tipo de célula alcanza su equilibrio en distintas posiciones de la cámara.



La cámara de sedimentación está iluminada por una luz estroboscópica y se puede observar directamente a través de un visor. **Cuando las células alcanzan el equilibrio se incrementa la velocidad del flujo y las células son empujadas hacia el exterior, donde se recogen en tubos apropiados.**

El equilibrio se alcanza en pocos minutos y la separación se puede llevar a cabo en unos 30 minutos. En cada separación se pueden llegar a obtener hasta 10^8 células. Las células se pueden cultivar inmediatamente después de su separación, hasta alcanzar la concentración deseada.

Dos inconvenientes de esta técnica son que (1) el aparato es bastante caro y (2) se necesita adquirir mucha experiencia antes de llegar a conseguir separaciones eficaces.

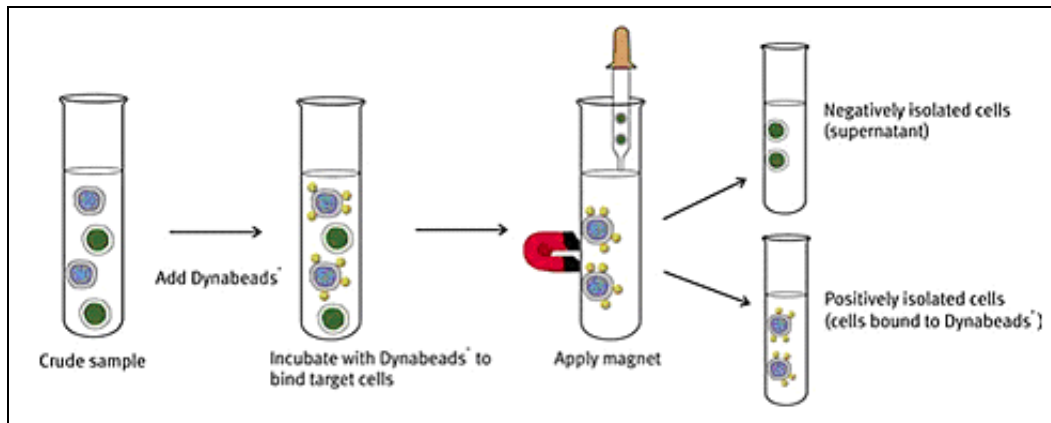
SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA

Estas técnicas se basan en el uso de **anticuerpos unidos a la superficie de unas esferas formadas por un material superparamagnético** (es decir, que sólo son magnéticas en presencia de un campo magnético) **recubierto de un polímero**. Los anticuerpos se unen de manera específica a un antígeno presente en la superficie de un tipo celular concreto y, mediante un simple imán, se pueden separar las células que se han unido a los anticuerpos de las demás. Existen en el mercado **dos sistemas** de separación de células basados en el uso de esferas superparamagnéticas unidas a anticuerpos: **Dynabeads[®]** y **MACS[®]**.

1.- Dynabeads[®] (Invitrogen)

Son unas esferas de poliestireno cuyo interior contiene hierro, lo que le confiere propiedades superparamagnéticas. Su tamaño es uniforme, con **un diámetro de 4,5 micras** (comparable al tamaño de una célula). Sobre su superficie **se pueden unir covalentemente diversos ligandos biorreactivos**: anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, estreptavidina, oligonucleótidos, etc. Veamos, a modo de ejemplo, cómo se realiza la separación de tipos celulares con Dynabeads[®] unidas a un anticuerpo (primario o secundario). **La separación se realiza en tres pasos**:

- 1.- **Unión**: una vez añadidas a la muestra, los anticuerpos de las Dynabeads[®] se unen directamente a aquellas células que expresan sobre su superficie el antígeno correspondiente (si las Dynabeads[®] están unidas a un **anticuerpo primario**) o a anticuerpos previamente unidos al antígeno (si las Dynabeads[®] están unidas a un **anticuerpo secundario**).
- 2.- **Aplicación del campo magnético**: mediante un imán, se separan las Dynabeads[®] (junto con las células que llevan unidas) del resto del material presente en la muestra. Se retira todo el material no seleccionado y se hace un par de lavados con medio libre de células.
- 3.- **Separación**: se retira el imán y se resuspenden las Dynabeads[®] (junto con las células seleccionadas) en un medio libre de células. Para separar las Dynabeads[®] de las células se pueden utilizar **enzimas proteolíticas** o un compuesto comercial denominado **DETAChA[®]BEAD**, que contiene anticuerpos solubles que compiten con los anticuerpos de las Dynabeads[®] a la hora de unirse al antígeno. En algunos casos es posible seguir trabajando con las células seleccionadas sin tener que separarlas de las Dynabeads[®].



La selección celular puede ser:

- **Positiva:** cuando las Dynabeads[®] se unen a las células que nos interesa seleccionar.
- **Negativa.** cuando las Dynabeads[®] se unen a las células que no interesan. Este tipo de selección es el que hay que utilizar cuando es importante que las células seleccionadas estén intactas.

En algunos casos, la separación celular se hace **en varias etapas** en las que se combinan selecciones negativas y selecciones positivas.

2. Microesferas MACS[®] (*Magnetic-activated cell sorting*) (*Miltenyi Biotec*)

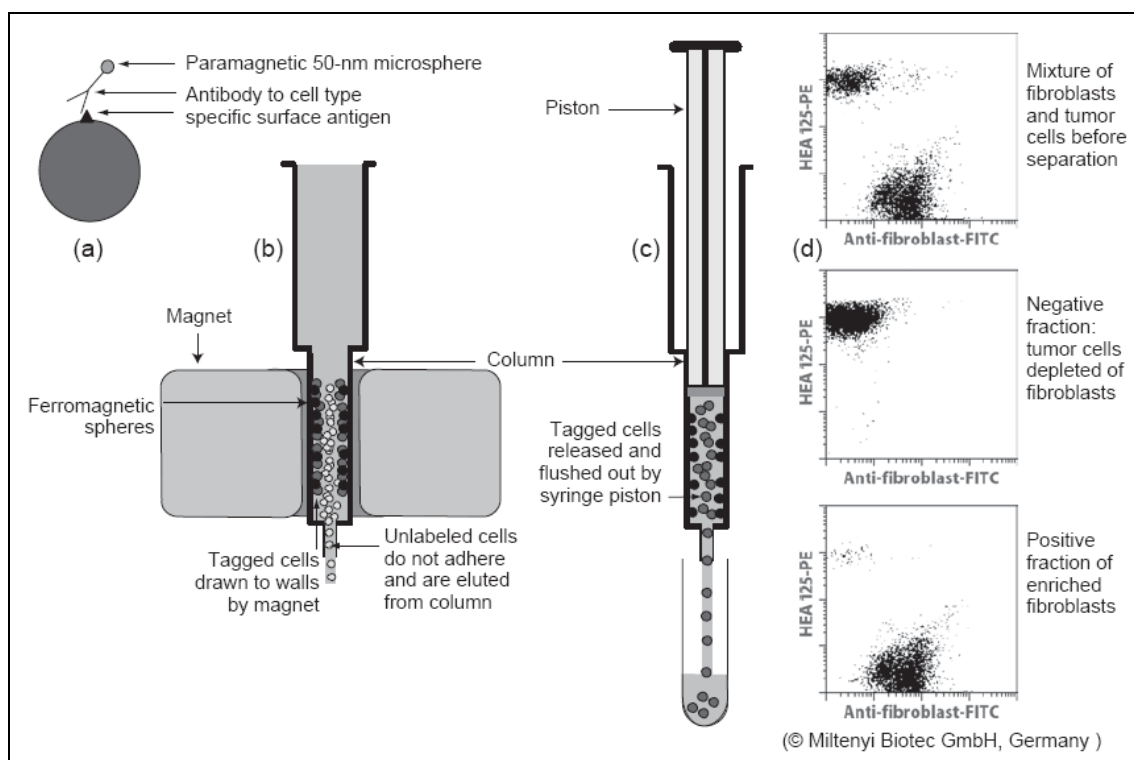
Son partículas superparamagnéticas formadas por óxido de hierro y polisacáridos (dextranos). Son muy pequeñas, con un **diámetro aproximado de 50 nm** (~ 100 veces menor que el de las Dynabeads[®]), y se encuentran unidas a anticuerpos específicos. Al ser tan pequeñas, no alteran ni la estructura, ni la función, ni la actividad de las células. No son tóxicas y son biodegradables. Aunque se las denomina “microesferas”, en realidad se trata de nanopartículas, de modo que sería más correcto decir que son “nanoesferas”.

La separación se lleva a cabo haciendo pasar la muestra a través de **una columna** que contiene una matriz de esferas ferromagnéticas recubiertas de un material inerte que no daña las células. Cuando **se coloca la columna sobre un imán**, las esferas crean un **campo magnético de gran intensidad** que atrae fuertemente las microesferas MACS[®] y las células unidas a ellas, mientras que las células que no se han unido a las microesferas MACS[®] fluyen libremente a través de la columna. Se necesita un campo magnético muy intenso porque las microesferas son muy pequeñas y las células están mínimamente marcadas.

La separación se realiza en tres pasos:

- 1.- **Unión:** una vez añadidas a la muestra, los anticuerpos (u otros ligandos) de las microesferas MACS[®] se unen directamente a aquellas células que expresan sobre su superficie el antígeno correspondiente.

- 2.- Se hace pasar la muestra a través de una columna MACS[®] colocada sobre un imán: las microesferas MACS[®] y las células unidas a ellas quedan retenidas en el interior de la columna, mientras que las células que no se han unido a las microesferas MACS[®] fluyen libremente. Se hace un par de lavados con medio libre de células para arrastrar todo el material que no se ha quedado retenido en la columna.
- 3.- **Elución:** al retirar la columna MACS[®] del soporte magnético el campo magnético desaparece y las células seleccionadas se pueden eluir fácilmente con la ayuda de un émbolo. Las células están listas para ser cultivadas y/o analizadas, ya que **no es necesario separar las microesferas**.

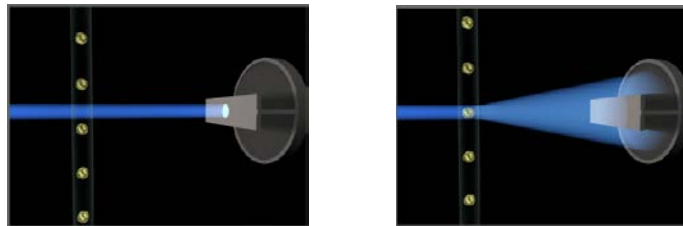


La selección de las células puede ser **positiva** (si las microesferas MACS[®] se unen directamente a las células que se quieren seleccionar) o **negativa** (si las microesferas MACS[®] se unen a las células que no interesan). Para seleccionar algunos tipos de célula se pueden utilizar estrategias que combinen selecciones positivas y negativas.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo permite analizar, de forma simultánea, diversos parámetros de cada una de las células presentes en una población celular heterogénea. Además de **contar las células**, esta técnica obtiene información relacionada con el **tamaño** y la **complejidad interna** de cada célula. Utilizando anticuerpos marcados fluorescentemente también es posible **determinar el grado de expresión de determinadas proteínas** localizadas sobre la superficie celular.

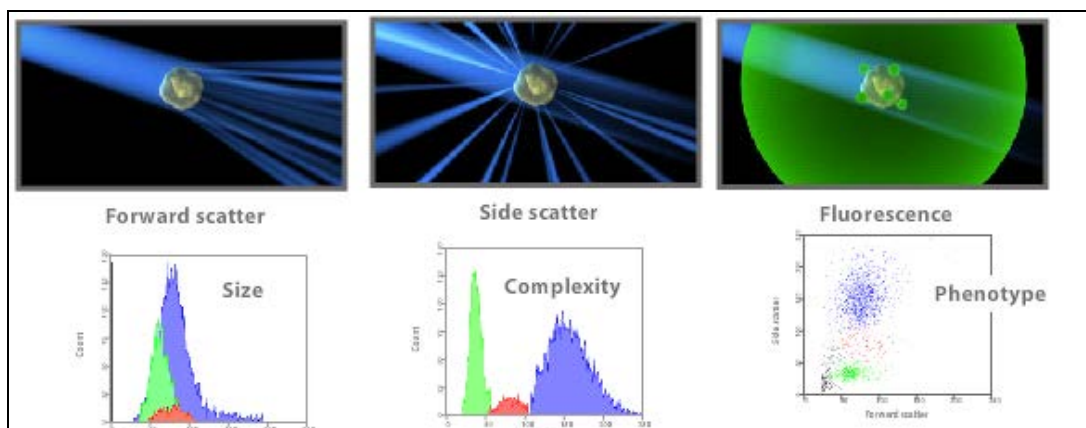
El citómetro de flujo **hace pasar las células, de una en una, a través de un rayo láser**. La luz que emerge de cada célula cuando el láser incide sobre ella es **captada por distintos detectores** y analizada. Cada detector ofrece un tipo de información distinto.



Los datos recogidos se **analizan estadísticamente** mediante el software del aparato, que elabora un informe detallado sobre las características de las células como, por ejemplo, su tamaño, su complejidad interna o su fenotipo.

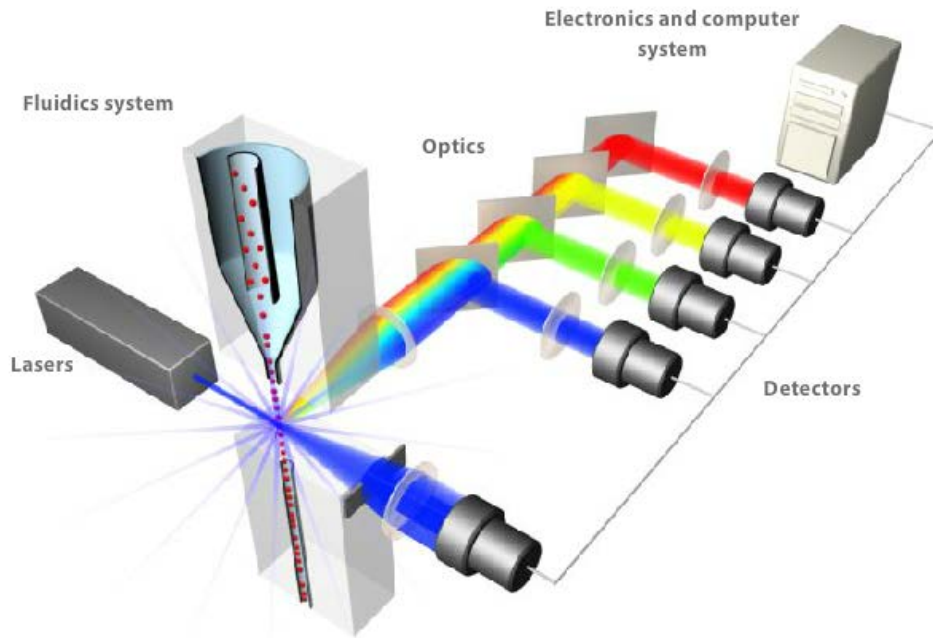
Cada detector ofrece un tipo de información distinto sobre la célula:

- Hay un **detector frontal** que recoge la luz difractada a ángulos bajos. Esta señal da información sobre el **tamaño** de la célula.
- Hay un **detector lateral** (perpendicular al láser incidente) que recoge la luz difractada a 90° . Esta señal da información sobre la **complejidad interna** de la célula.
- Hay **detectores laterales adicionales** que recogen la fluorescencia emitida por la célula a 90° después de haberla marcado con anticuerpos fluorescentes. Esta señal da información sobre la presencia o no de determinadas moléculas en la superficie celular (el **fenotipo**).



COMPONENTES DEL CITÓMETRO DE FLUJO

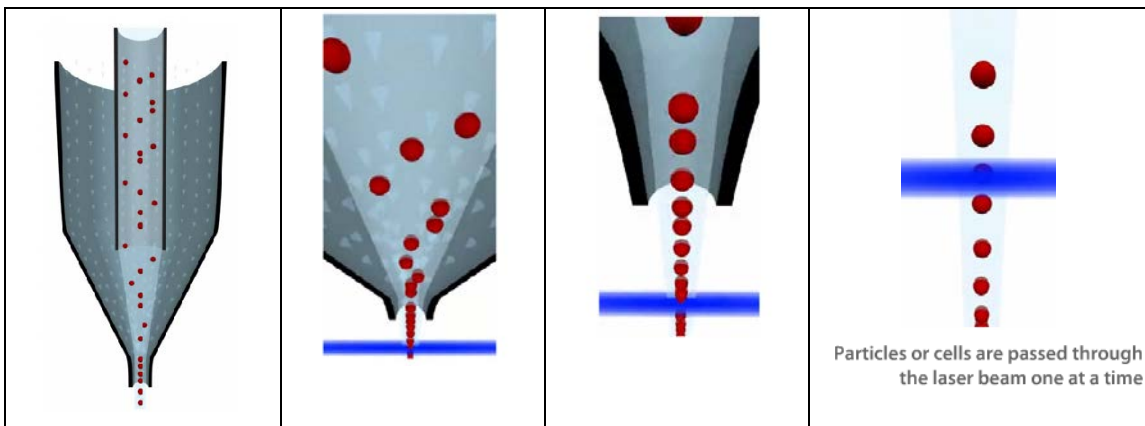
La figura inferior muestra, de manera esquemática, los principales componentes de un citómetro de flujo:



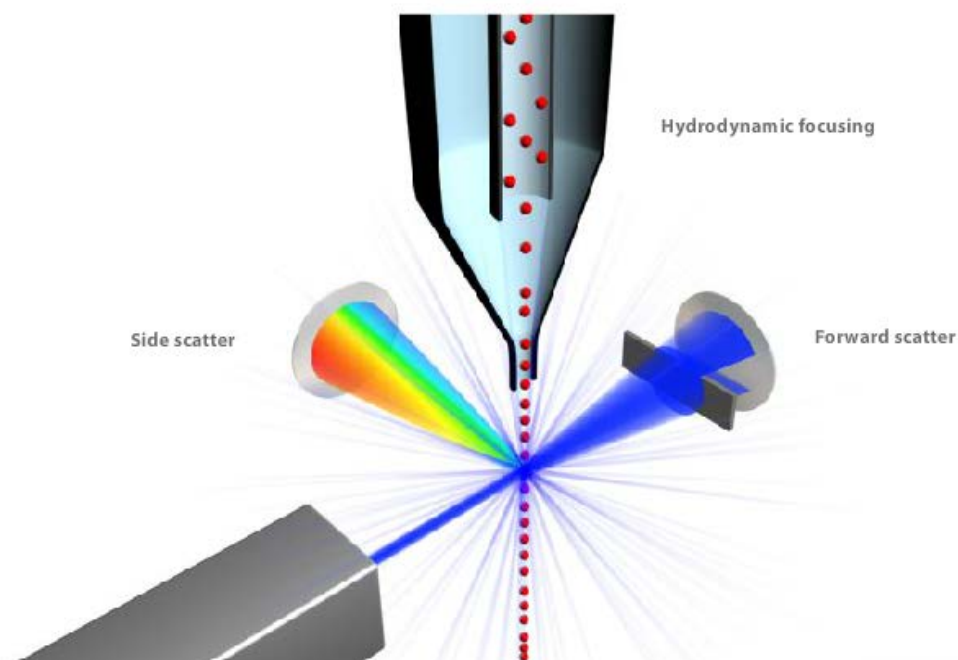
<p>Fluidics system</p>	<p>Lasers</p>	<p>Hydrodynamic focusing Side scatter Forward scatter</p>
<p>El sistema de fluidos se encarga de llevar la muestra hasta el punto de interrogación (el punto donde las células atraviesan el láser). También se encarga de eliminar los desechos.</p>	<p>El láser, es la fuente luminosa. Al incidir sobre las células, la luz se difracta. A determinadas longitudes de onda también es capaz de excitar los fluoróforos presentes en las células.</p>	<p>El punto de interrogación es el corazón del sistema. Aquí es donde la muestra atraviesa el láser para que el sistema óptico recoja las señales de difracción y de fluorescencia.</p>
<p>Optics</p>	<p>Detectors</p>	<p>Electronics and computer system</p>
<p>El sistema óptico recoge la luz difractada y/o la luz emitida por fluorescencia para dirigirla hacia los detectores.</p>	<p>Los detectores reciben la luz y la cuantifican.</p>	<p>Los circuitos electrónicos envían las señales de los detectores al computador, que las convierte en información digital para llevar a cabo los análisis necesarios.</p>

ENFOQUE HIDRODINÁMICO

Para recoger datos de forma precisa es fundamental que las células (o partículas) **pasen de una en una** a través del láser. En la mayoría de los citómetros esto se consigue haciendo que el tubo por donde circulan las células (y que en la figura inferior aparece representado en un color más claro) desemboque en el interior de otro tubo por el que circula un fluido envolvente a mayor velocidad. Este fluido envolvente es una disolución salina que rodea a la muestra (en la figura aparece representado de color más oscuro). Durante este proceso, el flujo que arrastra la muestra se va comprimiendo hasta alcanzar un espesor aproximadamente igual al diámetro de una célula. De este modo, las células llegan al punto de interrogación de una en una. Este fenómeno se denomina **enfoque hidrodinámico**. Los aparatos más modernos utilizan, además, un **enfoque acústico** que permite alinear las células utilizando una velocidad de flujo mayor.

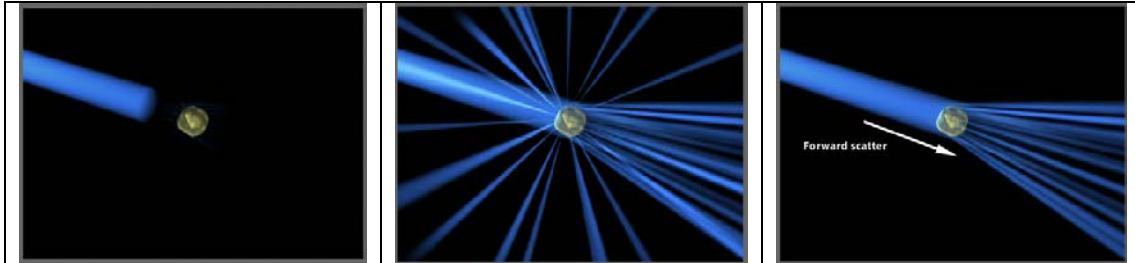


Cada célula llega por separado al punto de interrogación y a medida que atraviesa el láser se recoge información sobre sus características. Así se analizan todas y cada una de las células presentes en la muestra. El citómetro de flujo es capaz de analizar miles de células por segundo.

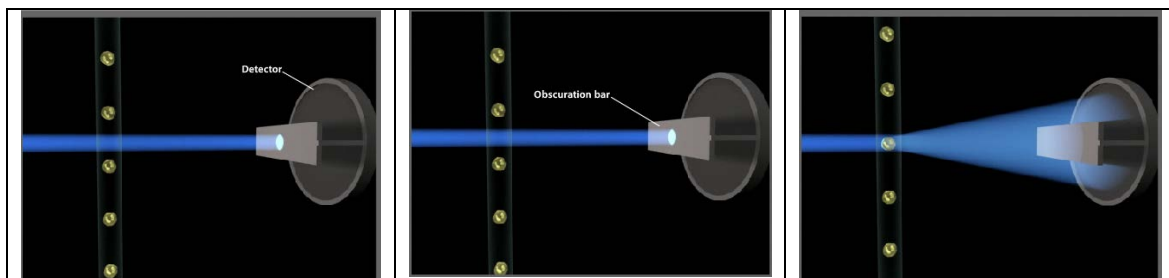


DETECCIÓN DE LA DISPERSIÓN FRONTAL

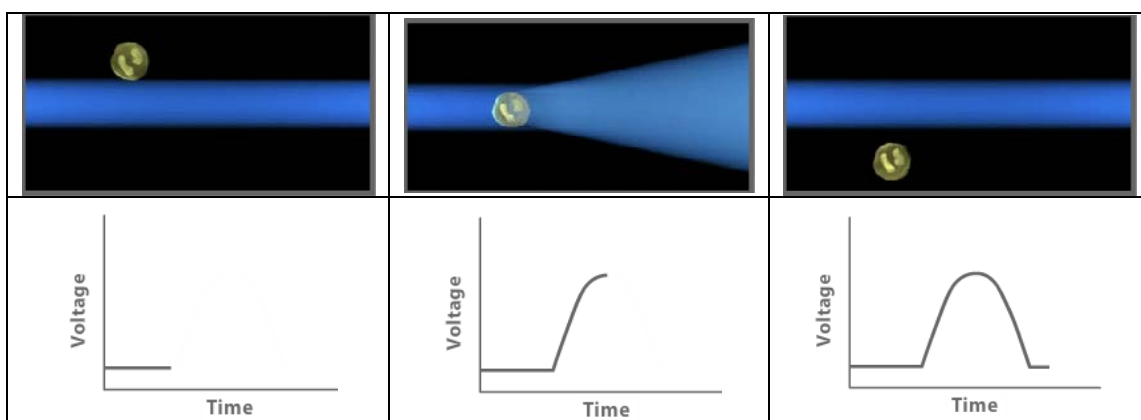
La luz que incide sobre la célula en el punto de interrogación se difracta y sale reflejada en todos los ángulos. La **difracción frontal**, también llamada difracción de luz **a bajo ángulo**, es la cantidad de luz que sale **dispersada hacia adelante** cuando el láser incide sobre la célula. La cantidad de luz dispersada hacia adelante **es aproximadamente proporcional al tamaño de la célula**.



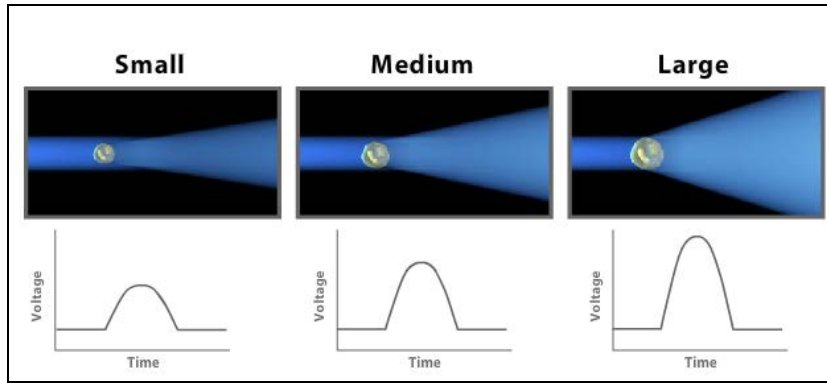
La luz se cuantifica por medio de un **detector que convierte la intensidad en voltaje**. En la mayoría de los citómetros hay una barra por delante del detector de dispersión frontal. Esta barra se llama barra oscurecedora y evita que la intensa luz del láser incida directamente sobre el detector cuando no ha encontrado ningún obstáculo en su camino (figuras inferiores izquierda y central). Cuando el láser se encuentra con una célula, la luz se dispersa alrededor de la barra oscurecedora y es recogida por el detector (figura inferior derecha).



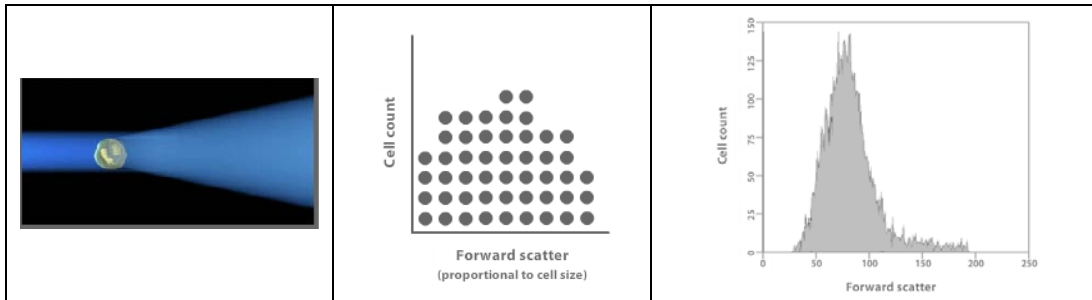
La luz dispersada que incide sobre el detector se convierte en un pulso de voltaje.



Si la célula es pequeña, la dispersión frontal es reducida y si la célula es grande, la dispersión frontal es elevada. Por tanto, **la magnitud del pulso de voltaje es proporcional al tamaño de la célula**.

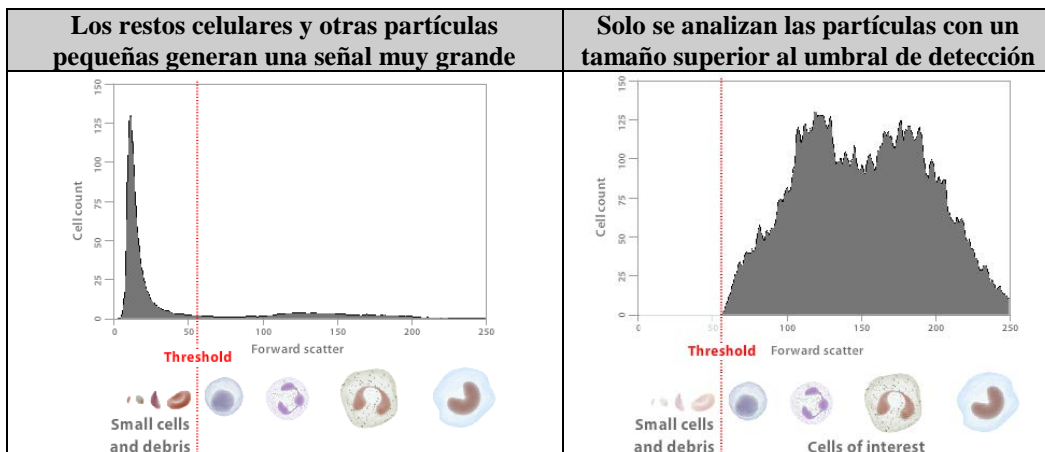


Si hacemos un **histograma** con estos datos, las células más pequeñas aparecen en la parte izquierda del histograma y las células más grandes en la parte derecha. Un histograma de la dispersión frontal es un gráfico que representa la **distribución de tamaños** de los distintos tipos de células presentes en la muestra. Hay que tener en cuenta que se trata de una **gráfica unidimensional**.



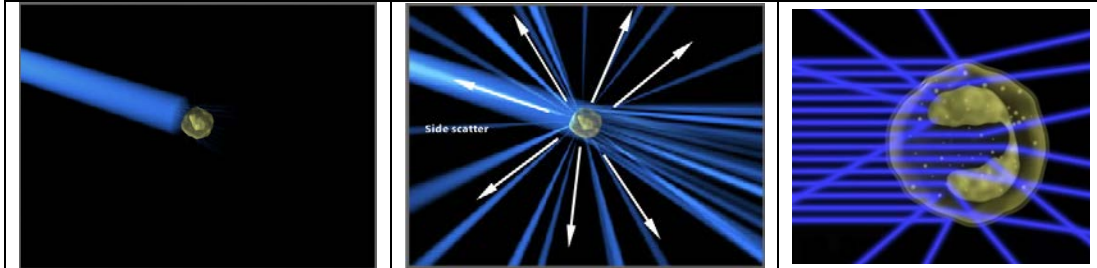
UMBRAL DE DETECCIÓN

Un aspecto importante que hay que considerar a la hora de estimar el tamaño de las células presentes en una muestra es que **hay que fijar un umbral de detección**. Como la muestra contiene gran cantidad de restos celulares y de otras partículas pequeñas, su señal será muy grande y no permitirá ver con detalle los componentes de mayor tamaño. Por eso, se fija un umbral y **las partículas con un tamaño inferior son ignoradas** (aunque también atraviesan el láser). **Sólo se tienen en cuenta las partículas con un tamaño que supere el umbral.**

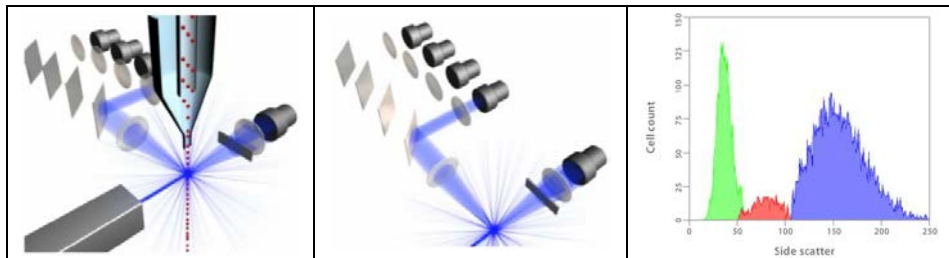


DETECCIÓN DE LA DISPERSIÓN LATERAL

La luz que incide sobre la célula en el punto de interrogación se difracta y sale reflejada en todos los ángulos. **La luz que se dispersa a ángulos mayores**, por ejemplo, hacia los costados, se denomina dispersión lateral. La dispersión lateral se debe a la **granularidad** y a la **complejidad estructural del interior de la célula**.

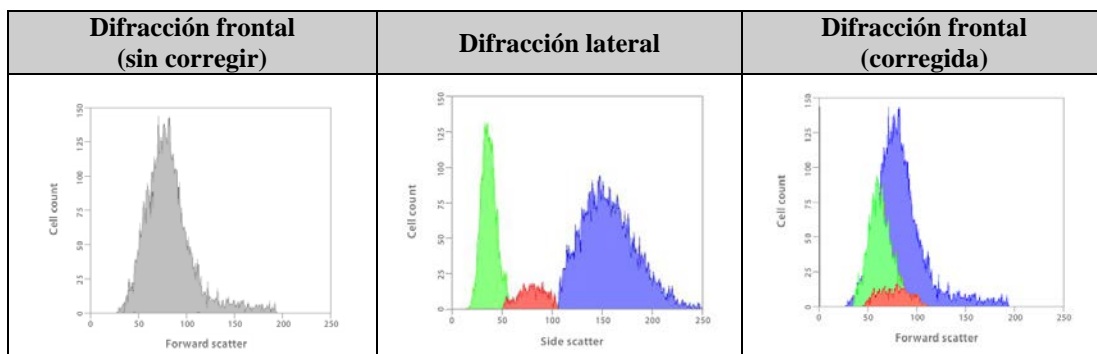


Esta luz dispersada lateralmente se enfoca mediante un sistema de lentes y se **recoge mediante un detector distinto**, que generalmente está orientado perpendicularmente (a **90°**) a la trayectoria del láser incidente. Las señales recogidas por el detector de dispersión lateral también se pueden representar por medio de **histogramas unidimensionales**.

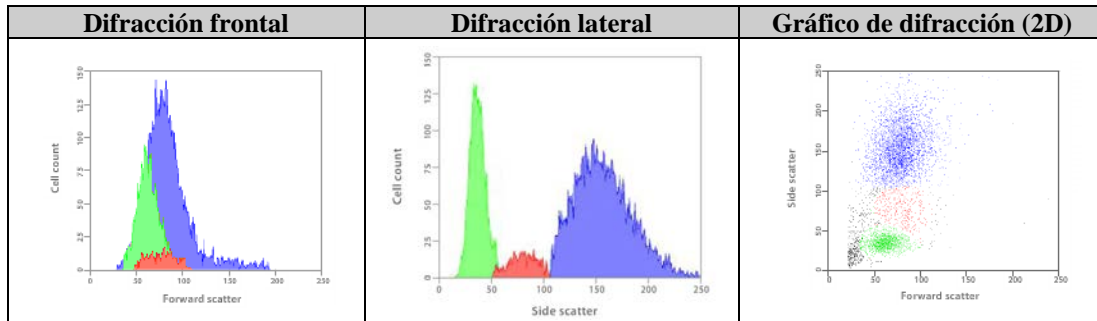


GRÁFICOS BIDIMENSIONALES

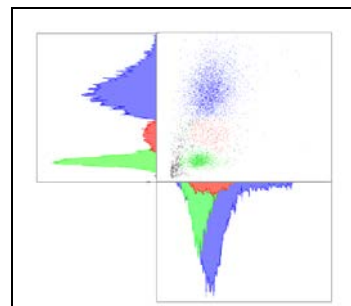
Los histogramas unidimensionales que hemos visto hasta ahora **no muestran necesariamente la complejidad de la población celular**. Por ejemplo, lo que en el histograma de difracción frontal parece ser una única población son en realidad múltiples poblaciones, tal y como nos indica el histograma unidimensional obtenido a partir de los datos de difracción lateral.



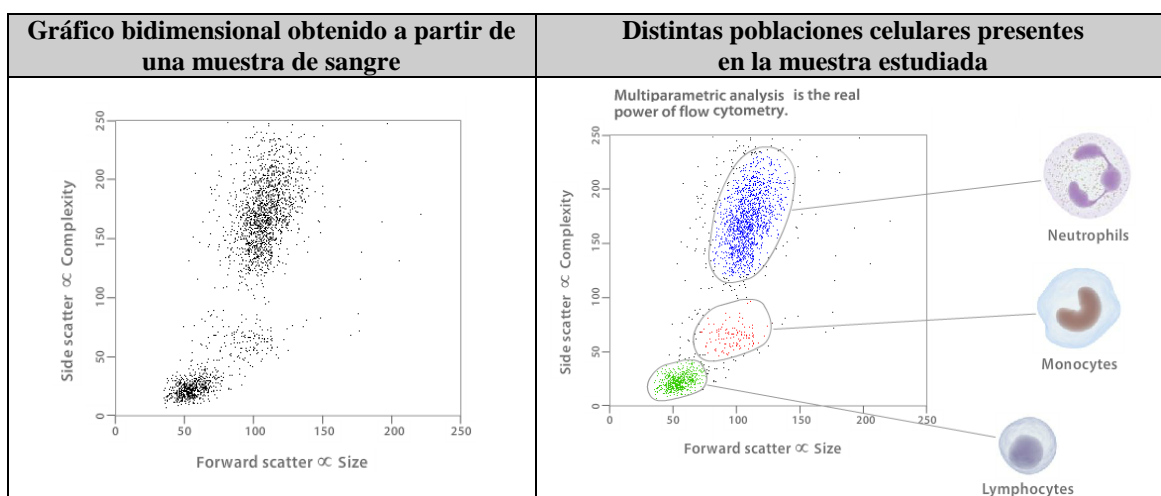
Para poder distinguir las diversas poblaciones celulares se tienen que representar los datos utilizando **dos dimensiones**. En el eje x (abscisas) se representan los datos de la difracción frontal y en el eje y (ordenadas) se representan los datos de la difracción lateral. Así se obtiene el denominado **gráfico bidimensional de puntos** o **gráfico de difracción**.



Se puede observar que los picos que aparecen en los histogramas unidimensionales de difracción frontal y de difracción lateral se correlacionan con las regiones de puntos coloreados que aparecen en el gráfico bidimensional.

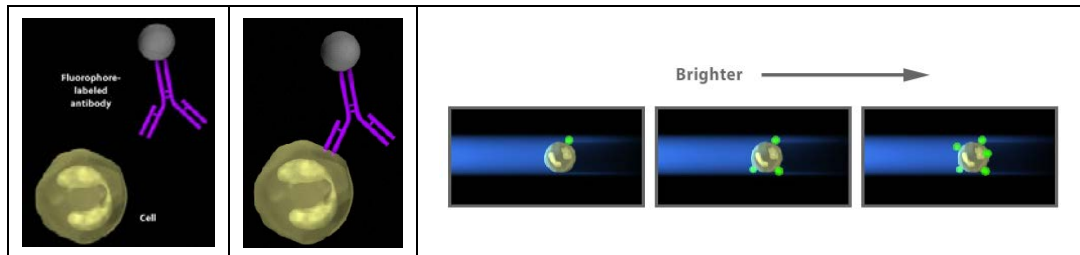


Veamos los resultados que se obtienen a partir una **muestra de sangre**. El gráfico de difracción bidimensional (que recoge los datos de difracción frontal y de difracción lateral) muestra tres tipos celulares: (1) los **linfocitos** (que son células pequeñas con poca complejidad interna), (2) los **monocitos** (células de tamaño medio y con algo más de complejidad interna) y (3) **neutrófilos y otros granulocitos** (células grandes con una enorme complejidad interna). El verdadero potencial de la técnica de citometría de flujo reside en la capacidad de realizar este análisis de múltiples parámetros.

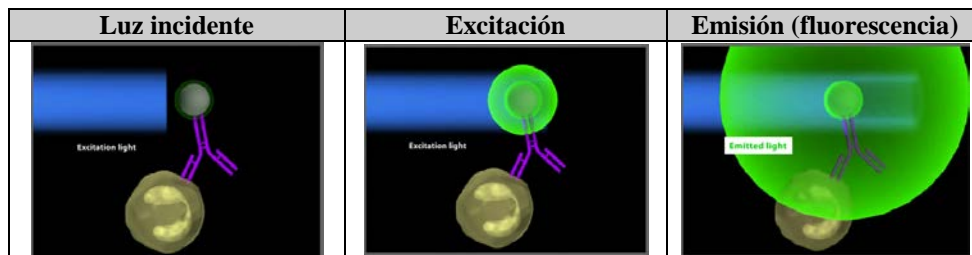


TÉCNICAS FLUORESCENTES EN CITOMETRÍA DE FLUJO

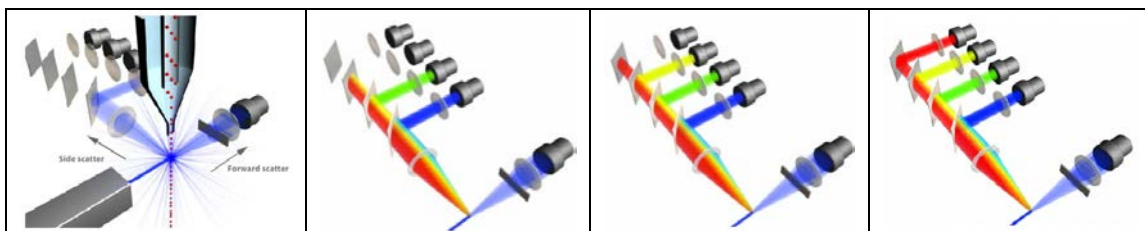
Una de las formas más frecuentes de estudiar las características celulares mediante citometría de flujo implica el uso de moléculas fluorescentes como, por ejemplo, **anticuerpos marcados con fluoróforos**. Cuando se añaden anticuerpos marcados a una muestra que contiene diversos tipos de células, los anticuerpos se unen de manera específica a aquellas células que presentan en superficie (o en su interior) el antígeno correspondiente. En una población de células marcadas, **algunas brillarán más que otras**, según cómo se hayan marcado.



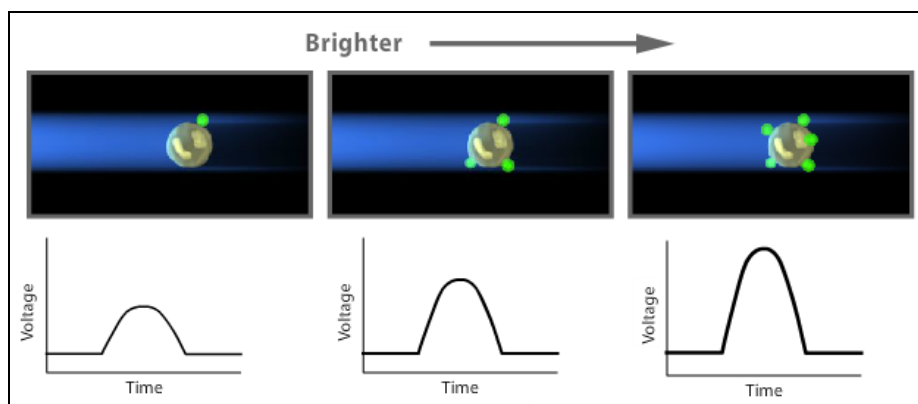
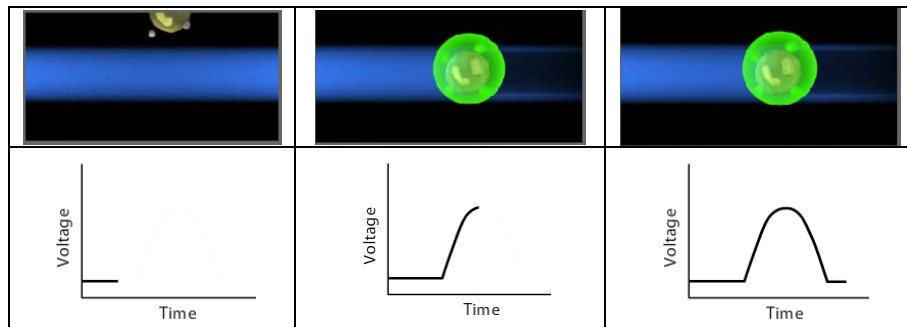
Cuando la luz de un láser con la longitud de onda adecuada (**luz de excitación**) incide sobre el fluoróforo, éste emite una señal fluorescente (**luz de emisión**) que tiene una longitud de onda característica para cada fluoróforo. Esta señal es detectada por el citómetro de flujo.



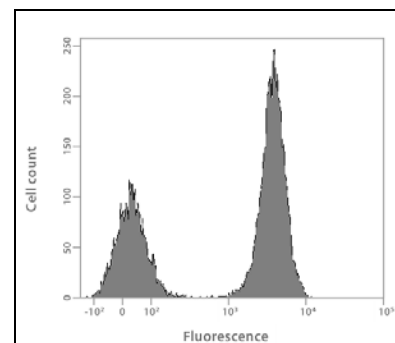
¿Cómo se recoge la señal de fluorescencia? Por regla general, los datos de fluorescencia se recogen del mismo modo que los datos de dispersión lateral. La luz fluorescente emitida por las células marcadas sigue el mismo recorrido que la luz dispersada lateralmente y **mediante una serie de filtros y espejos es dirigida hacia los detectores** adecuados, que están colocados **perpendicularmente** a la trayectoria del láser y que **sólo miden la luz de una determinada longitud de onda** (la característica para cada fluoróforo).



Cuando una célula atraviesa la trayectoria del láser se genera una señal de fluorescencia. La luz fluorescente se dirige hacia el detector apropiado, donde es convertida en un pulso de voltaje proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida.

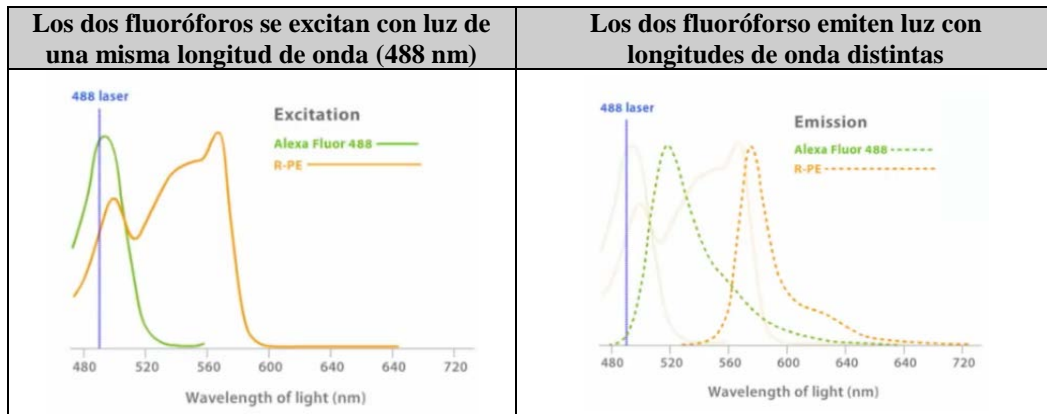


Se registra la totalidad de los pulsos de voltaje y se representan gráficamente mediante un **histograma unidimensional**. En la figura de la derecha se observan **dos poblaciones** celulares. Cada una de ellas ha resultado marcada de distinto modo mediante los anticuerpos fluorescentes: **en una población el marcaje es intenso y en la otra no**.

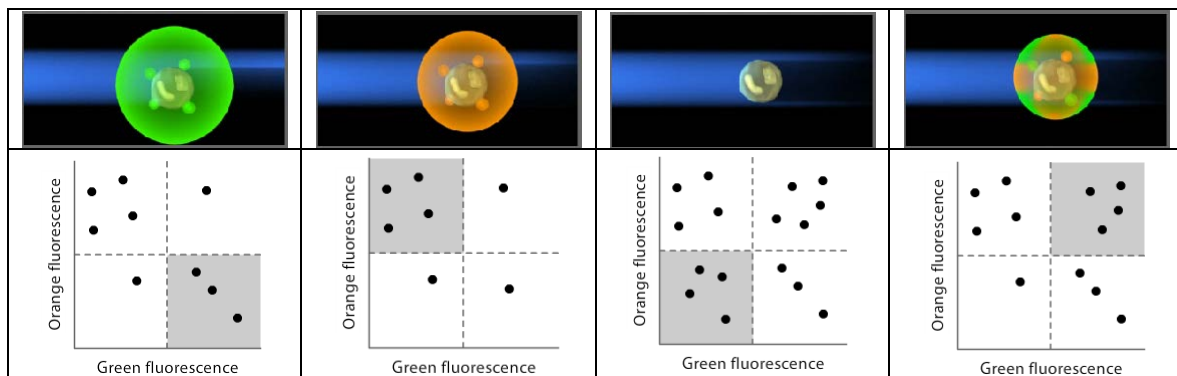


TÉCNICAS FLUORESCENTES QUE UTILIZAN DOS COLORES

Para hacer un experimento con dos colores debemos asegurarnos de que los dos fluoróforos sean compatibles. Por ejemplo, el Alexa-Fluor-488 y la ficoeritrina (R-PE) suelen usarse juntos con mucha frecuencia porque ambos se excitan con luz de una misma longitud de onda (488 nm). Sin embargo, la fluorescencia que emiten tienen longitudes de onda distintas (Alexa-Fluor-488 emite luz verde de 520 nm y la R-PE emite luz naranja de 580 nm) y, por tanto, se pueden detectar por separado, cada una con un detector distinto. En resumen, los dos se excitan con el mismo tipo de luz, pero después se recoge la emisión a dos longitudes de onda distintas, una para cada fluoróforo.



Si se analizan los datos de un experimento en el que se ha utilizado esta pareja de fluoróforos, el histograma bidimensional puede presentar **cuatro poblaciones celulares distintas**. Si dividimos el histograma en cuadrantes, (1) las células que **sólo estén marcadas en verde** darán una señal de fluorescencia localizada en el cuadrante inferior derecho, (2) las células que **sólo estén marcadas en naranja** darán una señal de fluorescencia localizada en el cuadrante superior izquierdo, (3) las **células que no estén marcadas ni en verde ni en naranja** darán una señal de fluorescencia localizada en el cuadrante inferior izquierdo, (4) las **células que estén marcadas en verde y en naranja** darán una señal de fluorescencia localizada en el cuadrante superior derecho.



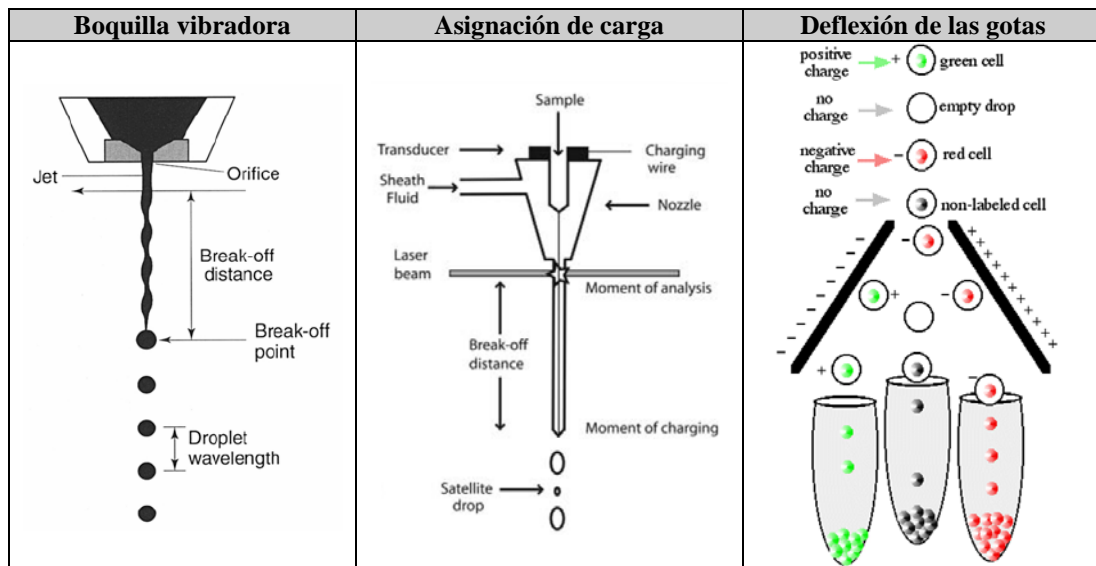
Toda esta información está basada en un vídeo que se puede encontrar en YouTube (está en inglés):

<http://www.youtube.com/watch?v=sfWWxFB1tpQ>

CLASIFICADOR DE CÉLULAS ACTIVADO POR FLUORESCENCIA (FACS)

Algunos citómetros de flujo (no todos) poseen una función denominada "**clasificación de células activada por fluorescencia**", o FACS, (*fluorescence-activated cell sorting*). Esta técnica está basada en la **deflexión electrostática de gotas cargadas** (es el mismo principio que hace funcionar a las impresoras de chorro de tinta) y **permite clasificar y separar las células en función del tipo de marcaje fluorescente que presenten**. En esencia, el método FACS es muy similar a la citometría de flujo, pero posee **tres características diferenciales**:

- 1.- **La boquilla vibradora**: La boquilla por donde sale el fluido que arrastra la muestra está acoplada a un cristal piezoeléctrico que la hace vibrar con una frecuencia y amplitud determinada. Esta vibración interrumpe el flujo continuo de la muestra y **hace que se formen gotas** de un tamaño prácticamente constante y con una distancia fija entre gota y gota. Una vez formada, la gota **puede tener una sola célula o no tener ninguna**.
- 2.- **Un dispositivo que asigna carga**: Nada más salir de la boquilla (antes de que se formen las gotas), **cada célula es analizada**. En función de la fluorescencia que presenta **se le asigna un tipo de carga** (positiva, negativa, o ninguna). Como cada gota que se forme después contiene una única célula, habrá **gotas con carga positiva, gotas con carga negativa y gotas sin carga**.
- 3.- **Las placas deflectoras**: Mientras están cayendo, **las gotas pasan entre dos placas cargadas** que establecen un campo eléctrico entre ellas. El voltaje que se establece entre las placas oscila entre 2 y 6 kV. **La trayectoria de caída de las gotas cargadas se desvía** hacia la placa que tenga polaridad opuesta, de modo que **cada tipo de gota se recoge en un tubo distinto**.



Los primeros aparatos solo podían seleccionar dos poblaciones celulares (positiva y negativa). Hoy en día, variando la cantidad de carga asignada, **es posible seleccionar cuatro poblaciones celulares distintas** (positiva y negativa, más o menos cargadas). Las células recogidas se vuelven a analizar para comprobar que la selección ha sido correcta y se pueden poner en cultivo para que alcancen la concentración deseada.