

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
INTA**

## **TRABAJO PRACTICO N° 2**

**Carrera: Ingeniería Civil en Biotecnología  
Curso: Biología Celular BT31B**

### **PROLIFERACION CELULAR**

#### **INTRODUCCION**

La proliferación se define como el aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular. De esta forma, las células proliferan aumentando su contenido de moléculas y orgánulos (crecimiento en masa o tamaño) y duplicando y segregando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales.

La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado, de acuerdo a las necesidades generales del organismo. Cada tipo celular se divide con una periodicidad óptima para el correcto mantenimiento y funcionamiento del organismo. Hay células que se dividen con gran frecuencia, como las que recubren la pared del intestino, y otras que lo hacen muy esporádicamente o incluso nunca, como la mayoría de las células nerviosas.

La proliferación celular es la base del desarrollo del organismo humano a partir del cigoto según un modelo de divisiones celulares en el que cada tipo celular se divide cuanto y cuando debe. Es altamente controlada en tejidos normales y es aberrante durante la carcinogénesis. Es por ello que se la considera como la raíz del primero de los procesos que origina un cáncer: el crecimiento descontrolado de un grupo de células.

La valoración de la proliferación celular es, muchas veces, la primera aproximación que el investigador tiene cuando se propone testear los efectos de una droga sobre la proliferación celular. Los ensayos desarrollados para medir este parámetro, van desde la utilización de agentes radioactivos como la incorporación de  $H^3$ , a la medición de metabolitos celulares, o la utilización de colorantes cuya concentración se correlaciona con el número celular. Muchas veces estos datos dan una buena idea al investigador sobre qué tipo de respuesta podría esperar de la droga al utilizarla *in vivo*.

#### **OBJETIVO**

Analizar la proliferación de células cultivadas *in vitro* en respuesta al suero fetal bovino (SFB), un estimulador usado generalmente en el cultivo de líneas celulares.

## METODOLOGÍA

### Materiales:

- Materia prima: línea celular de carcinoma endometrial humano (células Ishikawa)
- Placa de cultivo celular de 96 pocillos (microplaca)
- Micropipetas
- Puntas
- Tubos

### Reactivos:

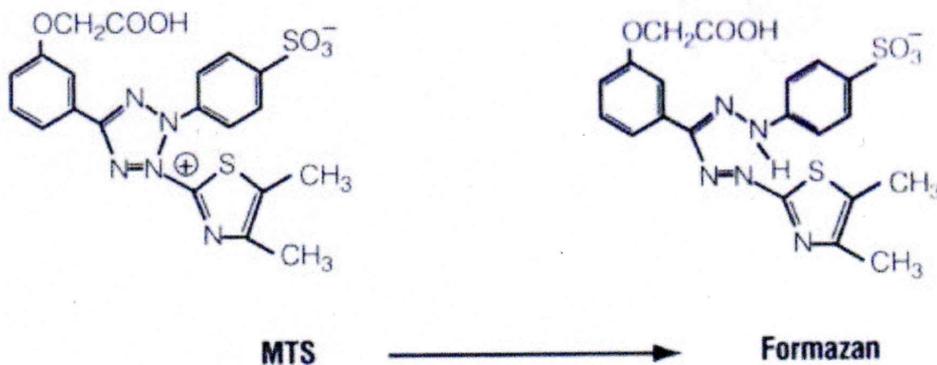
- Fosfato buffer salino: PBS
- Medio de Cultivo: DMEM F12
- Suero Fetal Bovino: SFB
- Reactivo MTS (sales de tetrazolium): es sensible a la luz, por lo tanto debe protegerse de la misma.

### Ensayo de proliferación:

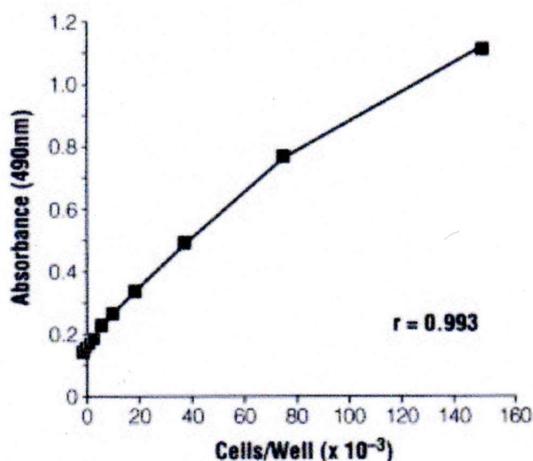
La capacidad mitogénica del SFB sobre células Ishikawa se medirá a través de un ensayo de proliferación colorimétrico. Para este ensayo se utiliza una sal de tetrazolium denominada "MTS" [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2H-tetrazolium, inner salt].

El MTS es bioreducido por las células a un producto coloreado llamado formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo (Figura 1). Esta conversión es realizada por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células metabólicamente activas (células viables). La cantidad de producto formado (formazán), medido por la absorbancia a 490nm, es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo (Figura 2).

**Figura 1.** Estructura de las sales de tetrazolium (MTS) y del producto formado (Formazán)



**Figura 2.** Efecto del número de células sobre la absorbancia medida a 490nm



## PROCEDIMIENTO

### Pasos previos realizados en días anteriores:

- 1) Para la realización del ensayo se utiliza una microplaca donde se siembran las células en estudio (densidad de siembra =  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>).
- 2) Luego de la siembra, las células se estimulan con distintas concentraciones de SFB (1, 2.5, 5 y 10%) durante 24 h.

### Pasos a realizar en el día del trabajo práctico:

- 1) Rotular los tubos con la concentración de SFB correspondiente: 1, 2.5, 5 y 10%.
- 2) Agregar a los tubos rotulados el medio de cultivo (DMEMF12) y el SFB necesario para conseguir las concentraciones de suero indicadas en el punto anterior:
  - SFB 1%: 6ul SFB + 594ul DMEMF12
  - SFB 2.5%: 15ul SFB + 585ul DMEMF12
  - SFB 5%: 30ul SFB + 570ul DMEM F12
  - SFB 10%: 60ul SFB + 540ul DMEMF12
- 3) Lavar cada uno de los pozos con 100ul de PBS.

- 4) Agregar a cada uno de los pozos 100ul de DMEMF12 + SFB (preparado previamente en distintas concentraciones) siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3
A	Blanco	Blanco	Blanco
B	Control	Control	Control
C	1% SFB	1% SFB	1% SFB
D	2.5% SFB	2.5% SFB	2.5% SFB
E	5% SFB	5% SFB	5% SFB
F	10% SFB	10% SFB	10% SFB

Además de los pozos estimulados con DMEMF12 + SFB, es necesario considerar pozos utilizados como "controles" del ensayo y pozos utilizados como "blanco".

Los "pozos controles" tendrán células Ishikawa y serán estimulados con 100ul de DMEMF12 (*sin SFB*).

Los "pozos blanco" *no tendrán células*, serán estimulados con 100ul de DMEMF12 (*sin SFB*), y se utilizarán como una forma de corregir la absorbancia del background.

*Por lo tanto, a los valores obtenidos en los pozos control y experimentales, se les debe restar el "promedio obtenido de los tres pozos blanco", a fin de obtener los valores de absorbancia corregidos.*

- 5) Se aplica 20ul del reactivo MTS en cada uno de los pozos de la placa, y se cubre la placa a fin de protegerla de la luz.
- 6) Se homogeniza el medio celular de la placa con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pueda obtener una *mezcla regular del reactivo MTS* en el medio de cultivo. (MUY IMPORTANTE)
- 7) Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) durante 60 min.
- 8) Se lee la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 490 nm en un contador ELISA para microplacas.
- 9) Inmediatamente, se vuelve a incubar la placa en la estufa de cultivos celulares durante 30 min adicionales, y posteriormente se realiza la lectura en el lector (protegida de la luz).

10) Registrar los resultados obtenidos de las lecturas a los 60 y 90 minutos, en los siguientes cuadros:

Lecturas de la DO a los 60min:

	1	2	3	MD	SD
A					
B					
C					
D					
E					
F					

DO: densidad óptica a 490nm

MD: media aritmética; SD; desviación estándar

Lecturas de la DO a los 90min:

	1	2	3	MD	SD
A					
B					
C					
D					
E					
F					

## **INFORME**

Debe incluir los siguientes aspectos:

**Introducción:** donde se presente una exposición breve sobre el tema desarrollado en el trabajo práctico.

**Hipótesis planteada:** para desarrollar el trabajo práctico.

**Objetivo del trabajo desarrollado:** con el fin de corroborar la hipótesis.

**Materiales y Métodos:** explicar en forma resumida y con una secuencia coherente, los materiales (tipo celular, reactivos, etc.) y el método utilizado (ensayo de proliferación).

**Resultados:** graficar el efecto de las distintas concentraciones utilizadas de SFB sobre la absorbancia a 490nm (colocando en el "eje de las x" los distintos % de SFB, y en el "eje de las y" los valores de absorbancia (DO) obtenidos, tanto a los 60 min (gráfico A) como a los 90 min (gráfico B).  
En el caso de que la hipótesis no se corrobore, señale las posibles fuentes de error.

**Discusión y Conclusiones:** enumerar las conclusiones principales según los resultados obtenidos