

Profesores:	Z. Gerdtzen O. Porras
Auxiliar:	N. López
Ayudantes	B. San Martín N. Martínez
Ayudante laboratorio	I. Prat

TRABAJO PRÁCTICO

CULTIVO CELULAR

Cultivo celular: principios en la determinación de la viabilidad celular

La microscopía ha sido una herramienta fundamental en el desarrollo de la biología celular. En esta línea, la implementación del cultivo celular como modelo de estudio ha permitido conocer las diversas interacciones entre sus partes constituyentes (organelos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) y los mecanismos moleculares que en su conjunto determinan la fisiología celular. El cultivo de tipos celulares que comparten propiedades funcionales únicas se configuran como un material atractivo para estudiar la modulación de tales funciones, así como también determinar su pertinencia en la solución a problemáticas en otros dominios.

Cada tipo celular requiere condiciones de cultivo particulares, las cuales están determinadas en la especie de origen, el estado de desarrollo del tejido de donde provienen, este último nos orienta acerca de factores de crecimiento que son fundamentales para permitir la proliferación del cultivo. En su gran mayoría estas condiciones se determinan en forma empírica.

Por otra parte, el tiempo que una célula se mantiene en cultivo depende de su capacidad proliferativa *in vitro*. Así, por ejemplo, las células transformadas ya sea porque fueron inmortalizadas introduciendo alteraciones genéticas o porque derivan de tumores, pueden mantenerse por meses e incluso años en cultivo. Sin embargo, inevitablemente pierden algunas propiedades. 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 organelos (crecimiento en masa o tamaño) para finalmente, duplicar y segregar un juego completo de cromosomas para cada célula hija, fenómeno conocido como división celular.

La proliferación celular sigue un estricto programa cuyo control está supeditado a las necesidades generales del organismo. La frecuencia de la división celular es particular del tipo celular y se relaciona con el mantenimiento y funcionamiento del tejido. Por ejemplo, las células que tapizan el lumen del intestino se dividen con alta frecuencia, mientras que las neuronas simplemente no proliferan.

La proliferación 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 el evento primario en la carcinogénesis: el crecimiento descontrolado de un grupo de células.

Puede estudiarse a través de la incorporación de biomoléculas radio-marcadas (^3H -timidina), la determinación de metabolitos celulares, la utilización de colorantes vitales cuya concentración es proporcional con el número celular, o la inmunodetección de marcadores de proliferación celular.

En este trabajo práctico utilizaremos dos técnicas de amplio uso para determinar la proliferación celular. La primera requiere del uso de la microscopia combinada con la tinción con **azul de tripán**, un colorante que sólo ingresa a las células si la membrana plasmática ha perdido su integridad por lo tanto permite distinguir entre células vivas y muertas. La segunda técnica, corresponde al conteo tras tinción con **crystal violeta** de núcleos de células adheridas.

Las actividades de este laboratorio corresponden a tareas de rutina de cualquier laboratorio que trabaje con células eucariontes y en virtud de las técnicas empleadas, se espera que converjan tópicos expuestos en las clases de membranas biológicas, adhesión celular, ciclo y homeostasis celular.

Reactivos:

- Solución de Azul de Tripán 0.4% (w/v) en PBS
- Tripsina/EDTA: 0.5% tripsina, 0.2% EDTA
- PBS (Buffer fosfato salino)
- Solución CV: 0.1 M ácido cítrico, 0.1% w/v Cristal Violeta, 2% w/v Triton X-100
- Placas de 12 pocillos
- Cámaras neubauer
- FBS: Suero Fetal Bovino
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ACTIVIDAD I

Objetivo: Determinar el efecto del suero bovino fetal (SBF) sobre la proliferación celular en cultivos de células PK15 por medio del conteo de células vivas.

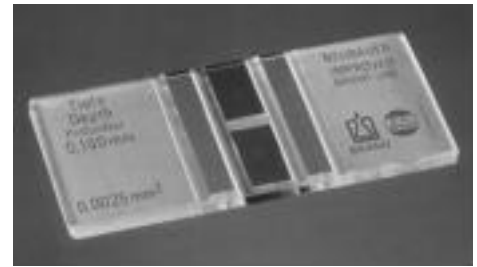
Una placa de 12 pocillos ha sido sembrada con igual cantidad de células por pocillo (**1×10^5 /pocillo**) al tiempo 0. La placa ha estado 24 horas en el incubador de manera tal que cada pocillo contiene diferentes concentraciones de Suero Bovino Fetal; 10-2-0%. Estas concentraciones se encuentran en duplicado. **Para esta parte de la actividad utilizará sólo la mitad de la placa (ver Figura).**

Metodología:

1. Observe la superficie del pocillo y tome nota de sus observaciones poniendo énfasis en lo siguiente: ¿cuánta superficie cubre la monocapa celular (puede hacerlo en términos porcentuales)? ¿Qué forma tienen las células? ¿Puede distinguir alguna estructura subcelular? ¿Se distinguen los bordes celulares?
2. Para contar células vivas:
 - Eliminar el medio de cultivo y lave los pocillos dos veces con 1 ml de PBS 1X, luego agregue 0.2 ml de tripsina/EDTA a cada pocillo y deje incubar la placa a 37°C por 5 min. Para cerciorarse de la acción de la tripsina, saque la placa de la incubadora y observe al microscopio un campo con células, ¿están adheridas a la superficie? Si están en suspensión, la tripsina ya soltó las células, si no, propine unos golpecitos a la placa (cuidado de no derramar medio hacia los bordes de los pocillos) y observe si las células se sueltan, si no lo hacen, deje la placa a 37°C por otros 2-3 min.
 - Inactive a la tripsina agregando 1 ml de DMEM con 10% Suero Bovino Fetal (FBS)

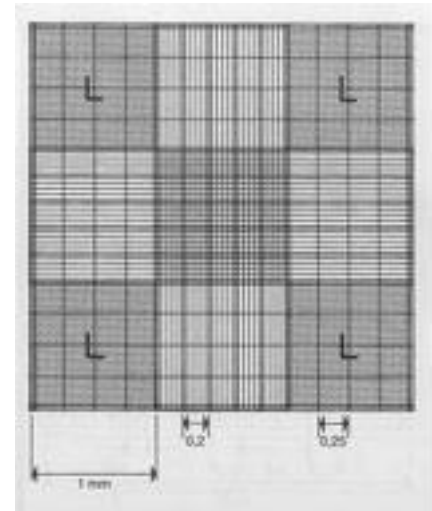
- Con la pipeta, homogenice la suspensión celular de cada pocillo (no haga burbujas pues estas al reventarse lisan las células) y tome 1 ml para guardarlo en un tubo eppendorf debidamente rotulado.

NOTA: En este punto proceda a dar inicio a la Actividad II (lavado con PBS e incubación con solución de CV). Luego prosiga con los pasos a continuación.



3. Realice el recuento celular en **cámara de Neubauer o hemocitómetro de campo claro**:

- Primero, limpie su cámara y cubrecámara con etanol al 70% y KimWipes. Observe la cámara en el microscopio para identificar la grilla que se muestra en la figura.
- Coloque 10 μL de la suspensión celular (previamente homogeneizada) y mezcle con otros 10 μL de una solución de azul de tripán (esto lleva la solución celular a una dilución 1:2). Cargue la cámara Neubauer con esta mezcla y observe al microscopio óptico con el objetivo 10X. Enfoque uno de los cuadrantes 'L' de las esquinas (4*4, ver figura anexa) y cuente las células del cuadrante.
- Repetir el conteo para los otros tres cuadrantes. Debe contar al menos 100 células en total.
- Calcular el número de células a partir de la siguiente fórmula:



$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células}}{\text{ml}} = \text{Recuento promedio} * \text{Dilución} * 10^4$$

Donde,

$$\text{Recuento promedio} = \frac{\sum_{i=1}^4 \text{Conteo cuadrante}}{4}$$

No olvide informar sus resultados de la siguiente forma **promedio $\pm$ Error estándar**.

NOTA: La cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en el laboratorio para el conteo de células en medio líquido, se utiliza junto con un microscopio óptico de cambio de fases o de contraste de fases. En el centro de la placa hay una depresión de 0,1 mm, la que permite que se forme una cámara cerrada cuando por encima se coloca un cubrecámara. Al fondo de la cámara está dibujada una cuadrícula como la que se observa en la figura. Es un cuadrado de 3mm x 3mm, el área marcada como L corresponde a 1 mm cuadrado. Por lo tanto, el volumen que encierra uno de los cuadrados L con su proyección hasta el cubrecámara es de 0,1 mm³, es decir 0,1 μL .

Utilice **sólo** solución de etanol y KimWipes para limpiar su cámara.

Al contar células con azul de tripán, debe fijarse en contar células vivas, es decir, aquellas que excluyen el colorante y por lo tanto, se ven como esferas blancas que refractan la luz. Por el contrario, las células teñidas, están muertas.

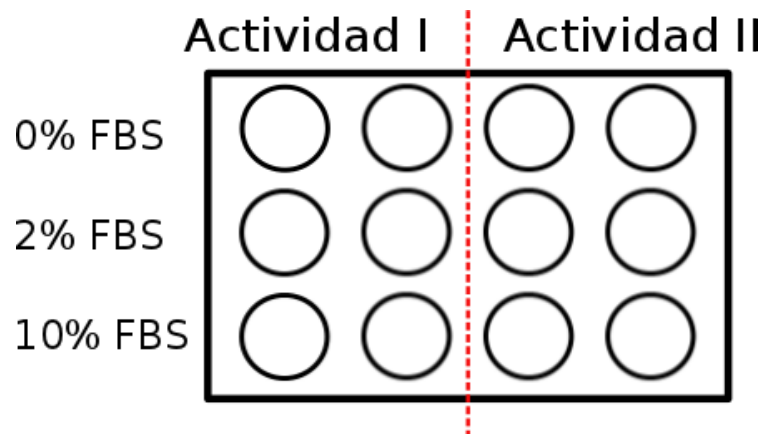
ACTIVIDAD II

Objetivo: Determinar el efecto del suero bovino fetal (SBF) sobre la proliferación celular en cultivos de células PK15 por medio del conteo de núcleos celulares. Contrastar la metodología de conteo con la utilizada en la Actividad I.

Una placa de 12 pocillos ha sido sembrada con igual cantidad de células por pocillo (1×10^5 /pocillo) al tiempo 0. La placa ha estado 24 horas en el incubador de manera tal que cada pocillo contiene diferentes concentraciones de Suero Bovino Fetal; 10-2-0%. Estas concentraciones se encuentran en duplicado. **Para esta parte de la actividad utilizará la segunda mitad de la placa (ver Figura).**

Metodología

1. Para contar núcleos celulares:
 - Elimine el medio de cultivo y lave los pocillos dos veces con 1 ml de PBS 1X, luego agregar 1 ml de solución de cristal violeta y dejar la placa a 37°C por 60 min o más.
 - Con la pipeta, homogenice la suspensión celular de cada pocillo y tome 1 ml para guardarlo en un tubo ependorff debidamente rotulado.
 - Realice el recuento celular en cámara de Neubauer o hemocitómetro directamente (sin diluir).



Resultados Actividad II: Usted observa un incremento de entre un 5 a 15% en el número de células (núcleos) respecto al conteo realizado en la Actividad I con Azul de Tripán. Explique esta observación.