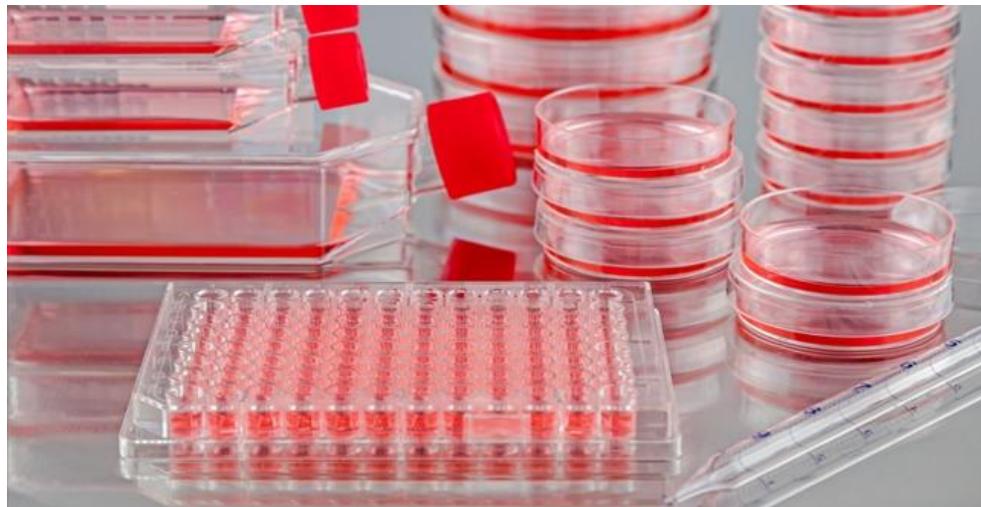


PRÁCTICAS OPTATIVA

ENTRENAMIENTO EN TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Alumna: Fiorela Nair, Petean

Director: Juan Pablo, Melana Colavita

Lugar de trabajo: Facultad de Medicina – Laboratorio de Bioquímica

Resolución: 2121/21



UNNE
Universidad Nacional
del Nordeste

Contenido

OBJETIVOS GENERALES	1
OBJETIVOS DEL PLAN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIALES.....	4
MÉTODOLOGÍAS	5
RESULTADOS	11
CONCLUSIÓN.....	14
BIBLIOGRAFÍA.....	15
ANEXO	16

OBJETIVOS GENERALES

- Proporcionar al alumno un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en distintos campos disciplinares de la Bioquímica.
- Alcanzar capacidades para el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías de laboratorio.

OBJETIVOS DEL PLAN

- Comprender y adquirir destreza en técnicas de cultivo de líneas celulares.
- Comprender y alcanzar habilidades en técnicas de biología molecular (RT-qPCR).
- Estudiar características generales de la línea celular RAW 264.7 mediante ensayos de rutina.
- Lograr habilidad en la búsqueda bibliográfica científica

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la técnica de cultivo celular se ha convertido en una herramienta de amplio uso en la investigación biomédica, tanto para lograr diferentes diagnósticos como diversos tratamientos.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento 'in vitro' de las células, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido, del órgano de origen y de su duración, encontramos diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios.

Ventajas:

- Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular).
- Caracterización y homogeneidad de la muestra: las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.
- Motivaciones éticas: la investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

Desventajas:

- Técnica sensible: la proliferación de las células animales es mucho más lenta que la de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.
- Se pueden hallar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente.
- Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que: se ha perdido la organización espacial propia del tejido, las interacciones, entre los distintos tipos celulares y entre las células y la matriz extracelular, careciendo de los componentes sistémicos de regulación.



Universidad Nacional
del Nordeste

Así mismo, las técnicas de cultivos celulares van de la mano con metodologías confirmatorias como son las técnicas de biología molecular. Existen un amplio espectro de técnicas de biología molecular, entre ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las más frecuentemente utilizadas por su capacidad confirmatoria. La PCR se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar.

El fundamento de qPCR (PCR cuantitativa o en tiempo real) es el mismo que la PCR de punto final, solo difiere en la forma en cómo se detectan y analizan los productos de amplificación. En este caso, la detección sucede en cada ciclo de la reacción. Dichas características representan grandes ventajas en esta técnica, ya que el producto es monitoreado conforme transcurre la reacción sin necesidad de un posterior análisis en gel de agarosa.

Además, otra técnica muy asociada a los cultivos celulares, es el ensayo de Scratch o herida. Se basa en un ensayo de caracterización celular, donde se evalúa la capacidad de migración celular.

MATERIALES

En todo momento durante el desarrollo del presente trabajo, se trabajó siguiendo las normas de bioseguridad.

Cultivos celulares:

- Células RAW 264.7
- Flask T25 y T75
- Pipetas
- Tips
- Tubos falcon
- Crioviales
- Incubadora
- Flujo de aire estéril vertical
- Guantes
- Tanque de nitrógeno
- Medios de cultivo
- Trypan Blue
- DMSO
- PBS-EDTA
- Alcohol 70%
- Amonio cuaternario
- Centrífuga
- Eppendorf
- Guardapolvo
- Microscopio invertido

RT- qPCR:

- Termociclador
- Reactivos de RT-qPCR

MÉTODOLOGÍAS

Para iniciar los cultivos celulares, se descongeló un criovial (proveniente de nitrógeno) correspondiente a la línea celular RAW 264.7 (Tabla 1) dentro de la cabina de flujo de aire laminar (Figura 1):

Categoría	Célula animal
Organismo	Murino
Tipo de célula	Macrófago
Derivación	Tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson
Productos necesarios	Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SFB), dimetilsulfóxido (DMSO).
Crecimiento	Adherente

Tabla 1: Características de la línea celular RAW 264.7. Datos provistos por la ATCC.



Figura 2: Cabina de flujo laminar vertical

- El criovial se colocó en agua a 37°C (descongelamiento rápido). El contenido del vial se diluyó en medio de cultivo completo dentro de un tubo Falcon de 15 mL.
- Se centrifugó a 1.5 G por 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en medio de cultivo completo (medio de cultivo DMEM + 10% de SFB. Anexo 1).
- Se analizó el número y viabilidad celular utilizando cámara de Neubauer y Trypan-Blue (colorante de exclusión).

Una vez calculado el porcentaje de viabilidad celular, las células se transfirieron a un flask (T25) y se llevaron a incubadora (Figura 2) a 37°C con atmósfera de 95% de aire, 5% de dióxido de carbono y humedad relativa.



Figura 2: Incubadora

Los cultivos fueron controlados de forma periódica.

En caso de desarrollo celular, se procedió de la siguiente manera (Figura 3):

- Se retiró el medio de cultivo.
- Se lavaron las células utilizando PBS 1X estéril.
- Se levantaron las células con PBS-EDTA
- Se adicionó medio de cultivo para inactivar el PBS-EDTA.
- Las células se transfirieron a un tubo Falcon para centrifugar.
- Se centrifugó a 1.5 G por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y con pellet celular se cuantificó nuevamente la viabilidad.



Figura 3: Células en proliferación

- Parte del total de células se volvieron a amplificar en flask T25 y otra parte se plaqueó (Figura 4), para ensayar diferentes experimentos.



Figura 4: Placas P6 con cultivos adherentes

Estimulación celular:

Las células en placas de 6 pocillos (P6) fueron incubadas por 24 horas para luego llevar a cabo un estímulo con lipopolisacárido (LPS) o noradrenalina (NA) y la combinación de ambos (LPS+NA), con previo reemplazo del medio de cultivo completo por medio restringido (1-5% de SFB), de los cuales se evaluaron los efectos a las 8 horas y 24 horas de tratamiento (Figura 5).

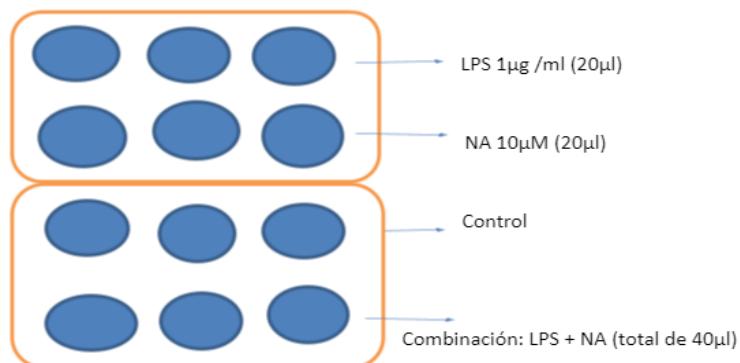


Figura 5: Esquema de tratamiento celular.

Estudio molecular de la expresión de citoquinas:

El siguiente paso fue la extracción de ARN:

- Se eliminó el medio de cultivo de los pocillos.
- Se lavaron las células con PBS 1X.
- Bajo campana de extracción, se adicionó reactivo TRIzol® a cada pocillo con células.
- El contenido de cada pocillo se llevó a un eppendorf, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ello, se procedió a seguir los pasos de la técnica de extracción con Trizol (Figura 6).

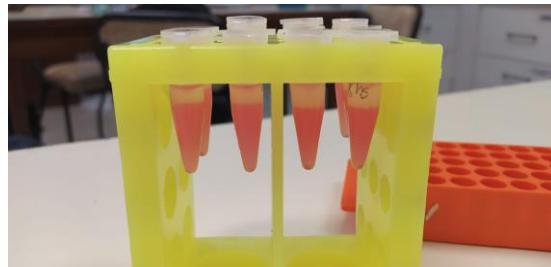


Figura 3: Eppendorf con fase acuosa y orgánica.

- Se leyeron las absorbancias a 260 nm y 280 nm.
- Se calculó la relación 260/280 para cada muestra.

Retrotranscripción:

Se retrotranscribieron a ADNc 8 muestras, utilizando las siguientes mix:

MIX 1	MIX 2
1 µg de ARN	MLV-RT (enzima retrotranscriptasa) 1 µL
Oligo-dT (50 pmol) 0,11 µL	MLV-RT buffer 5 µL
Random primers	RNAse out 0,625 µL
Llevar a volumen con agua DEPC	dNTP (desoxinucleótido trifosfatos) 1,125 µL
	Llevar a volumen con agua DEPC

Tabla 2: Protocolo de preparación Mix de retrotranscripción.

PCR Real time:

Se utilizó beta actina como housekeeping, y los genes targets analizados fueron: IL-6, TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) y TGF β (factor de crecimiento transformante beta).

Se prepararon la Master Mix para cada gen:

	µL para 1 tubo	µL para 8+1 tubo
MIX	2	18
Primer F	0,5	4,5
Primer R	0,5	4,5
Agua miliQ	3	27

Tabla 3: Protocolo de preparación Master Mix.

Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Esquema de la placa de qPCR:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NA 8 hs	NA 8 hs	LPS 8 hs	LPS 8 hs	Control 8 hs	Control 8 hs	LPS+NA 8 hs	LPS+NA 8 hs
B	NA 8 hs	NA 8 hs	LPS 8 hs	LPS 8 hs	Control 8 hs	Control 8 hs	LPS+NA 8 hs	LPS+NA 8 hs
C	NA 8 hs	NA 8 hs	LPS 8 hs	LPS 8 hs	Control 8 hs	Control 8 hs	LPS+NA 8 hs	LPS+NA 8 hs
D	NA 8 hs	NA 8 hs	LPS 8 hs	LPS 8 hs	Control 8 hs	Control 8 hs	LPS+NA 8 hs	LPS+NA 8 hs

Tabla 4: Formato de carga de la placa de qPCR.

A: beta actina

B: IL-6

C: TNF

D: TGF beta

Se colocaron las Master Mix en los pocillos de la placa (Figura 7) según el esquema de trabajo, luego se agregó la muestra, se sellaron los pocillos con film y se centrifugó la placa para eliminar posibles burbujas. Una vez esto, se colocó la placa en el termociclador.



Figura 7: Placa de qPCR de 48 wells. Termociclador para qPCR

Ensayo de migración:

Las células en cultivo fueron transferidas en cantidades optimas a placas de Petri estériles de 35 mm. Luego de 24 a 48 horas, con confluencia celular alta, se procedió a realizar una herida con una punta de micropipeta.

Se registraron fotografías cada 24 horas y el ancho de la herida fue analizado con el software ImageJ.



Universidad Nacional
del Nordeste

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos tanto de las PCR real time como del ensayo de herida, fueron analizados mediante el software Graph Pad Prism 7. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p<0,05$.

RESULTADOS

La cuantificación de los ARN obtenidos se realizó midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm de longitud de onda.

	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Relación 260/280
NA	0,242	0,133	1,82
NA	0,249	0,099	2,51
NA	0,259	0,121	2,14
LPS	0,247	0,112	2,20
LPS	0,173	0,092	1,88
LPS	0,296	0,144	2,05
CONTROL	0,257	0,121	2,12
CONTROL	0,303	0,147	2,06
CONTROL	0,205	0,091	2,25
LPS+NA	0,182	0,110	1,65
LPS+NA	0,160	0,086	1,86
LPS+NA	0,149	0,082	1,81

Tabla 5: Absorbancias de tratamientos a 24 horas

	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Relación 260/280
NA	0,202	0,105	1,92
NA	0,173	0,124	1,39
NA	0,250	0,148	1,69
LPS	0,158	0,113	1,40
LPS	0,184	0,117	1,57
LPS	0,222	0,134	1,66
CONTROL	0,126	0,085	1,48
CONTROL	0,102	0,069	1,48

CONTROL	0,139	0,083	1,67
LPS+NA	0,177	0,101	1,75
LPS+NA	0,177	0,093	1,90

Tabla 6: Absorbancias de tratamientos a 8 horas

La determinación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias por PCR real time, arrojo los siguientes resultados, no observándose diferencias significativas.

Plus	Experiment	Well	Role	Sample	Assay	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev.	ΔCq	ΔCq Mean	ΔCq Std. Dev.	ΔΔCq	RQ	RQ Lower Bound	RQ Upper
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_A4	U		LPS 8 h	B actin	33.52	33.37	0.22							
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_A5	U		Ctrl 8 h	B actin	35.72	35.42	0.42							
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_A6	U		Ctrl 8 h	B actin	35.12	35.42	0.42							
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_A7	U		LPS+NA 8 h	B actin	34.34	34.41	0.1							
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_A8	U		LPS+NA 8 h	B actin	34.48	34.41	0.1							
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B1	U		NA 8 h	IL-6	31.76	31.72	0.05	-4.98	0.15	0.1	0.9359894	0.8446755	1.0371747	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B2	U		NA 8 h	IL-6	31.69	31.72	0.05	-4.98	0.15	0.1	0.9359894	0.8446755	1.0371747	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B3	U		LPS 8 h	IL-6	28.78	28.85	0.11	-4.51	0.25	0.56	0.6761581	0.5690651	0.803405	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B4	U		LPS 8 h	IL-6	28.94	28.85	0.11	-4.51	0.25	0.56	0.6761581	0.5690651	0.803405	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B5	U		Ctrl 8 h	IL-6	30.38	30.35	0.04	-5.07	0.42	0	1	0.7472567	1.3382282	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B6	U		Ctrl 8 h	IL-6	30.32	30.35	0.04	-5.07	0.42	0	1	0.7472567	1.3382282	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B7	U		LPS+NA 8 h	IL-6	29.16	29.16	0	-5.25	0.1	-0.18	1.1292668	1.0560414	1.2144698	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_B8	U		LPS+NA 8 h	IL-6	29.16	29.16	0	-5.25	0.1	-0.18	1.1292668	1.0560414	1.2144698	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C1	U		NA 8 h	TNF	33.12	33.22	0.14	-3.48	0.2	-0.33	1.2612166	1.1014202	1.4441829	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C2	U		NA 8 h	TNF	33.32	33.22	0.14	-3.48	0.2	-0.33	1.2612166	1.1014202	1.4441829	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C3	U		LPS 8 h	TNF	31.38	31.22	0.22	-2.14	0.31	1	0.4994732	0.4031628	0.6187909	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C4	U		LPS 8 h	TNF	31.07	31.22	0.22	-2.14	0.31	1	0.4994732	0.4031628	0.6187909	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C5	U		Ctrl 8 h	TNF	32.53	32.27	0.37	-3.15	0.56	0	1	0.6790383	1.4726711	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C6	U		Ctrl 8 h	TNF	32.01	32.27	0.37	-3.15	0.56	0	1	0.6790383	1.4726711	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C7	U		LPS+NA 8 h	TNF	29.55	29.75	0.29	-4.66	0.31	-1.51	2.8482096	2.2969391	3.5286915	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_C8	U		LPS+NA 8 h	TNF	29.96	29.75	0.29	-4.66	0.31	-1.51	2.8482096	2.2969391	3.5286915	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D1	U		NA 8 h	TGFB	36.83	36.3	0.75	-0.4	0.77	0.08	0.9483955	0.5570649	1.6146306	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D2	U		NA 8 h	TGFB	35.76	36.3	0.75	-0.4	0.77	0.08	0.9483955	0.5570649	1.6146306	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D3	U		LPS 8 h	TGFB	35.41	35.24	0.23	1.88	0.32	2.36	0.1952438	0.1562166	0.2440211	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D4	U		LPS 8 h	TGFB	35.08	35.24	0.23	1.88	0.32	2.36	0.1952438	0.1562166	0.2440211	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D5	U		Ctrl 8 h	TGFB	35.16	34.94	0.31	-0.48	0.52	0	1	0.8958181	1.4371571	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D6	U		Ctrl 8 h	TGFB	34.72	34.94	0.31	-0.48	0.52	0	1	0.8958181	1.4371571	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D7	U		LPS+NA 8 h	TGFB	36.6	36.55	0.08	2.14	0.13	2.61	0.1632385	0.1409059	0.1789507	
	Placa 8hs Nahuel y Fio 08-04-22_D8	U		LPS+NA 8 h	TGFB	36.49	36.55	0.08	2.14	0.13	2.61	0.1632385	0.1409059	0.1789507	

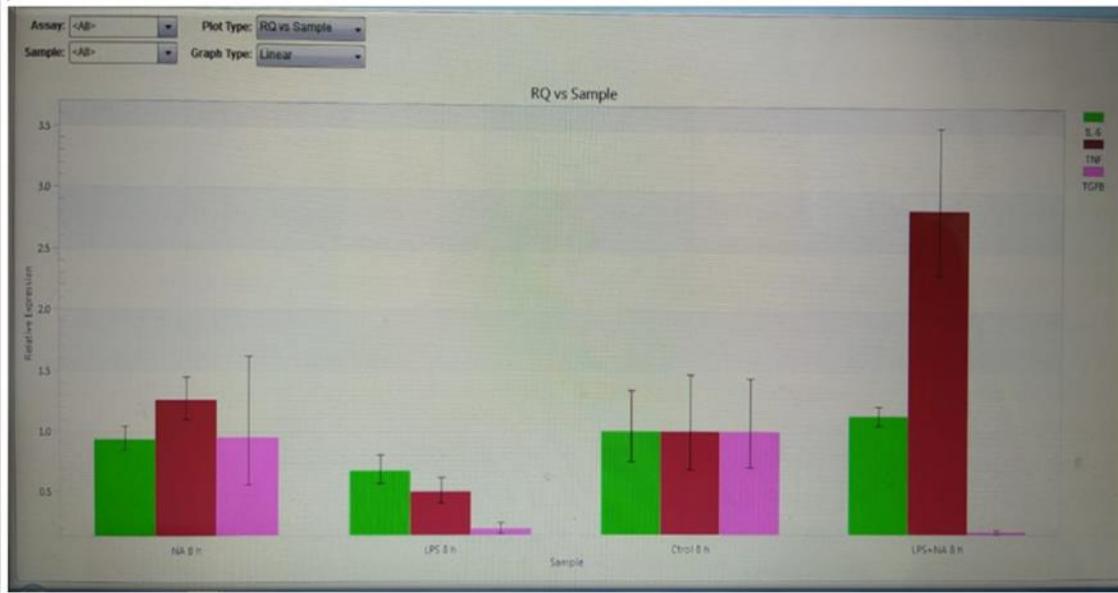


Figure 8: Niveles de expresión de citoquinas en células RAW 264.7 tratadas con LPS, NA y LPS+NA.

Ensayo de la herida:

Las fotografías obtenidas cada 24 horas fueron analizadas con el software ImageJ. Si bien se observó una disminución del ancho de la herida a las 24 y 48 horas (Figura 9 B y C), las diferencias halladas no son significativas.

A las 72 horas (Figura 9 D) se observó una reducción significativa de la densidad celular circundante a la herida, momento en el cual finalizó el experimento.

Valores de los anchos de la herida a diferentes tiempos medidos:

- A: Tiempo cero. Longitud 106,12.
- B: 24 horas. Longitud 96,25.
- C: 48 horas. Longitud 84,10
- D: 72 horas. Longitud 102,8.

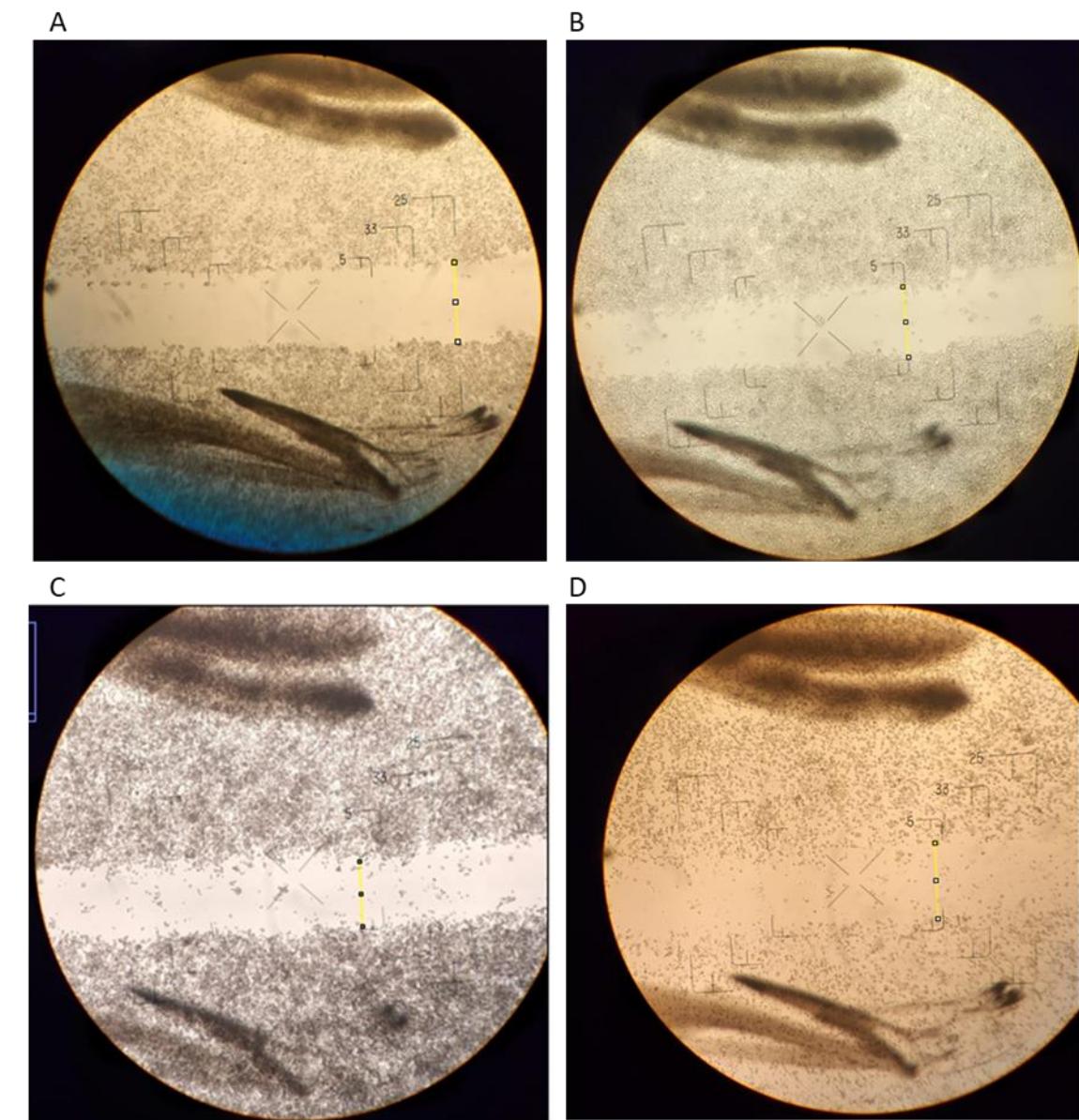


Figure 9: Ensayo de la herida. Seguimiento hasta 72 horas posteriores al Scratch.



Universidad Nacional
del Nordeste

CONCLUSIÓN

Al finalizar las actividades planteadas en dicha práctica optativa, logré cumplir con los objetivos propuestos; entre ellos puedo mencionar la adquisición de conocimientos teóricos y prácticos en relación a las metodologías de cultivos celulares y RT-qPCR. Así mismo alcance destreza en el proceso de búsqueda bibliográfica (como el uso de la plataforma NCBI) y en la utilización de ciertos softwares como: ImageJ, Mendeley y Graph Pad Prisma 7.

Si bien los resultados experimentales obtenidos no fueron los esperados, logré un amplio conocimiento, manejo y entrenamiento en dichas metodologías aplicadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Baust, JM, Buehring, GC, Campbell, L. et al. Mejores prácticas en cultivo celular: una descripción general. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal 53, 669–672 (2017).
<https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
- Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. World J. Stem Cells 2019, 11, 1065–1083, doi:10.4252/wjsc.v11.i12.1065.
- Chen, Q., Wang, Y. La aplicación del cultivo celular tridimensional en la medicina clínica. Biotechnol Lett 42, 2071-2082 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03003-y>
- Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Front. Mol. Biosci. 2020, 7, 1–15, doi:10.3389/fmolsb.2020.00033
- Markovic, O., Markovic, N. Celular contaminación cruzada en cultivos celulares: el peligro silencioso y desatendido. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal 34, 1–8 (1998).
<https://doi.org/10.1007/s11626-998-0040-y>
- Scott, C. Cell culture. Bioprocess Int. 2011, 9, 24–31, doi:10.1016/j.cell.2010.05.043
- Melana, J. P.; Rodriguez, J. P.; Stoyanoff, T. R.; Espalda, J. D.; Todaro, J. S.; Aguirre, M. V. (2016). Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo “in vitro” para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste*, 1 (1), 1-12
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2 (2), 70-78

ANEXO

Preparación del medio de cultivo DMEM:

- Se colocó agua destilada estéril en un vaso de precipitados (de suficiente capacidad) con agitador magnético.
- Se disolvió el medio DMEM.
- Se pesaron los antibióticos (penicilina y estreptomicina) y bicarbonato.
- Una vez que todo se disolvió, se midió el pH y se ajustó el mismo a 7,4.
- Se trasvasó la solución de medio de cultivo a un matraz de 1 litro y se enrasó con agua destilada estéril.
- Se filtrar utilizando filtros de 0,22 µm.



Figure 10: Procesos de disolución y filtración de medio de cultivo.