

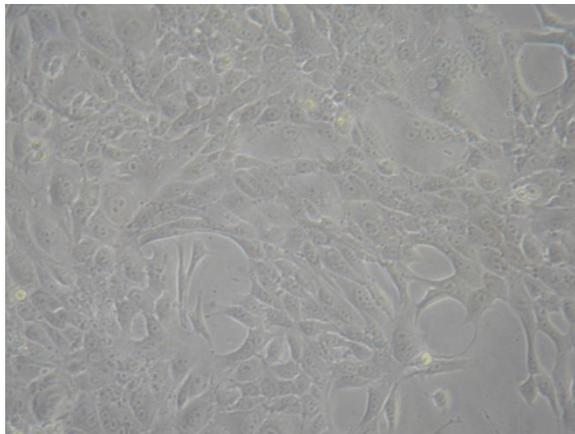
Biología Celular y Molecular

Guía de TP Nro. 2

Mantenimiento de líneas celulares

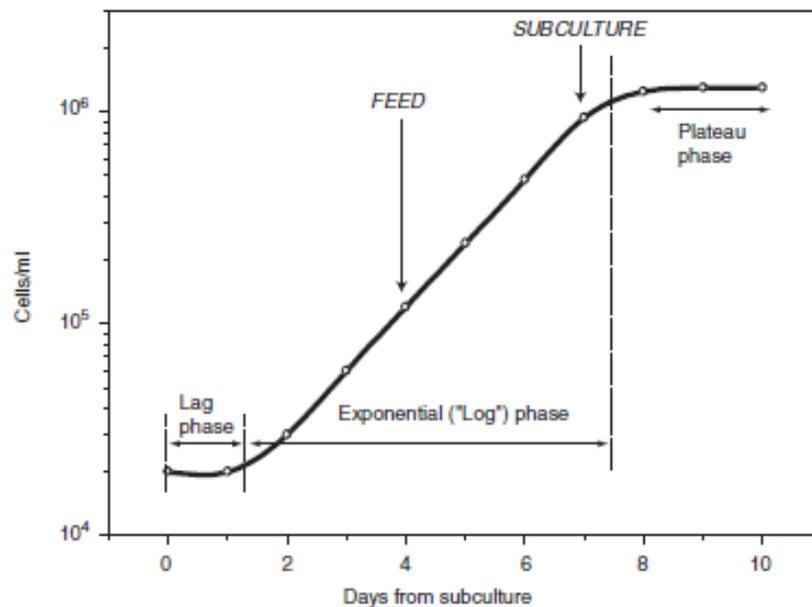
Introducción

Una de las formas de crecimiento *in vitro* es el cultivo en monocapa. Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.



Células F3II (carcinoma mamario murino) creciendo en monocapa

Por lo tanto, para poder mantener la monocapa viva por períodos largos en cultivo es necesario realizar un repique o pasaje con cierta periodicidad. Esta metodología consiste en remover el medio de cultivo que se encuentra en contacto con las células, levantarlas del sustrato, disociarlas, y luego resembrar en un nuevo sustrato. Este procedimiento se realiza al final de la fase log, antes de que las células entren en el plateau de crecimiento.



Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, by R. Ian Freshney
 Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Inc.

Es necesario definir algunos conceptos para instalar un lenguaje común en el manejo de líneas celulares:

- **CULTIVO CELULAR:** Término utilizado para denominar el crecimiento de células in vitro, incluyendo el cultivo de células aisladas. En los cultivos celulares, las células no están organizadas en verdaderos tejidos.
- **CULTIVO PRIMARIO:** El cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo. Un cultivo primario debe ser considerado como tal hasta que se subcultive (o repique) con éxito por primera vez. En ese momento se considera una línea celular.
- **DENSIDAD DE SATURACION:** El máximo número de células mantenible bajo condiciones específicas de cultivo en un recipiente. Este término se expresa usualmente como el número de células por centímetro cuadrado en una superficie de cultivo o el número de células por centímetro cúbico en un cultivo en suspensión.
- **EFICIENCIA DE SIEMBRA (ADHESION):** El porcentaje de células sembradas que se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo en un tiempo determinado. Siempre deben establecerse las condiciones bajo las cuales se realizó la determinación.
- **LÍNEA CELULAR:** Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso. El término línea celular implica que los cultivos de la misma consisten en numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario. Los términos finita o continua son usados como prefijo si se conoce el

estado del cultivo. Si no, el término línea es suficiente. El término línea continua reemplaza al término línea establecida.

- MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO: Una solución nutritiva para cultivo de células siendo conocida la estructura química de cada componente. Aunque se sabe que aún los compuestos químicos puros pueden tener algunos contaminantes, se deben usar compuestos químicos de alta calidad con datos analíticos, si es posible, de los contaminantes.
- PASAJE (REPIQUE): La transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Se entiende que siempre que las células se transfieren de un recipiente a otro, una cierta porción de éstas se pierde y que por lo tanto, se produce la dilución de las células en forma deliberada o no. Este término es sinónimo del término subcultivo.
- PASAJE NUMERO (REPIQUE NUMERO): El número de veces que las células en cultivo han sido subcultivadas. En la descripción de este proceso debe establecerse la relación o dilución de las células a fin de determinar la edad relativa del cultivo.

Protocolo TP2-Día 1

Objetivo

Realizar un pasaje o repique de una línea celular creciendo en monocapa para su mantenimiento en cultivo.

Materiales

Reactivos de cultivo

- D-MEM (Medio Esencial Mínimo Modificado)
- SFB (Suero Fetal Bovino)
- Tripsina + EDTA
- PBS (Buffer Fosfato Salino)

Materiales generales

- Pipetas de vidrio estériles (2, 5 y 10 ml)
- Descarte
- Tubos cónicos de 15 ml estériles
- Propipeta automática

Desarrollo de la práctica

Los alumnos recibirán un frasco T25 con células creciendo en monocapa a una confluencia ~70%. Se utilizarán células de carcinoma mamario murino F3II (Alonso et al, 1996).

1. Observar al microscopio el frasco (Superficie:25 cm²) que se va a subcultivar para ver si la monocapa es continua y uniforme.
2. Insertar una pipeta de 2 ml en la propipeta automática y descartar el medio de cultivo del frasco.
3. Lavar 3 veces con PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (también puede utilizarse solución fisiológica).
4. Cubrir la monocapa con cantidad suficiente de solución de tripsina + EDTA (0.5 ml aproximadamente) e incubar unos minutos en la estufa a 37°C.
5. Observar atentamente la monocapa una vez agregada la tripsina, esta tiene un tiempo de acción entre 5-15 minutos; cuando se vean los primeros signos de desprendimiento celular, golpear la botella a fin de levantar toda la monocapa celular.
6. Agregar D-MEM (3 ml), homogeneizar la monocapa pipeteando enérgicamente hasta lograr una suspensión de células únicas. Deshacer los acúmulos celulares pipeteando reiteradamente.
7. Retirar el líquido de la botella y transferirlas a un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 ml, al que **previamente** se le ha agregado SFB (0.3 ml) para inactivar la tripsina.
8. Centrifugar a 800 rpm durante 10 minutos.
9. Retirar el medio del tubo de centrifuga con pipeta de 2 ml.
10. Agregar 2 ml de D-MEM y homogeneizar el pellet.
11. Realizar el recuento celular: Se usa azul tripán para teñir las células, ya que permite distinguir las células viables de las que no lo son. Estas últimas han perdido su permeabilidad selectiva y se tiñen de azul, mientras que las células viables permanecen incoloras (Ver recuadro abajo).
12. Una vez obtenido el número de células por mililitro, se procederá a sembrar un frasco de 25 cm² estéril. Para ello se deberá primero preparar el medio en el cual se cultivarán dichas células. Composición del medio de cultivo: 5% SFB en D-MEM
Ejemplo: Para prepara 5 ml de medio habrá que agregar 250 µl de SFB y 4.75 ml de D-MEM.
13. Una vez preparado el medio y teniendo en cuenta que las células F3II presentan una **densidad de saturación** de 180.000 células/cm² , y que su **tiempo de duplicación** es de 17.7 hs; calcular el número de células que habrá que sembrar para llegar a **confluencia** en 5 días, utilizando la siguiente fórmula:

$$\underline{ND = \text{Log}_{10} (N/N_0). 3.33}$$

$$\underline{N_0 = NF / 2^{ND}}$$

Dónde:

ND: número de duplicaciones en lapso de tiempo considerado.

N: número de células en el recipiente de cultivo al final del período de crecimiento.

N₀: número de células iniciales en el recipiente de cultivo.

Importante: en los cálculos tener en cuenta que el porcentaje de adhesión es del 70%.

14. Realizadas las cuentas necesarias, tomar una alícuota del tubo donde se encuentra la suspensión celular (RESUSPENDER!) correspondiente al Nro calculado y mezclarla con el volumen de medio necesario (5 ml) para efectuar la siembra.
15. Incubar a 37°C en atmósfera humidificada, con gaseo conteniendo 5% CO² en aire.

Preparación de azul tripán – Recuento de células

1. Preparar la solución de azul tripán: 4 partes de la solución A (40 µl) + 1 parte de la solución B (10 µl) en un eppendorf de 0.6 ml.
2. Tomar una alícuota de la suspensión celular (50) µl (RESUSPENDIDA!) y mezclarla con la solución de azul tripán (50 µl).
3. Sembrar con micropipeta en una cámara de Neubauer.
4. Contar las células viables (brillantes, refringentes, no coloreadas) contenidas en los cuadrados. Sacar un promedio. Calcular las células por la dilución con el azul tripán. Calcular las células por mililitro de suspensión, luego multiplicar por el volúmen inicial para calcular el N° total de células.

Ejemplo: Se tiene 2 ml de una suspensión celular de la cual se toman 50 ul. Se diluyen con 50 ul de azul tripán. Se siembra la cámara de recuento. Se cuentan los cuatro campos de 16 cuadrados cada uno. Volumen de 1 recuadro de 16 cuadrados = lado x lado x altura = 1 mm x 1 mm x 0.1 mm = 0.1 mm³.

Si los cuatro campos arrojaron los siguientes valores: 29, 31, 25, 27

Se obtiene el promedio (29 + 31 + 25 + 27 = 112 → 112/4 = 28 células por cada recuadro de 16 cuadrados (0.1mm³)), quedando 28 cel/0,1 mm³.

Se corrige por la dilución al medio realizada con azul tripán. Aquí será 28 x 2 = 56 cel / 0,1mm³ Se lleva a cantidad de células por ml (cm³) multiplicando por 10⁴, o sea 56 x 10⁴ = 560.000 cel / ml. Se calcula el N° total de células de la suspensión. En este caso como teníamos inicialmente 2 ml de suspensión será: 560.000 x 2 ml = 1.12 x 10⁶ células totales.

Protocolo TP2-Día 2

Uno de los métodos de preservación por tiempo indefinido de células es por medio de la congelación en nitrógeno líquido. Los pasos cruciales dependen de adecuadas velocidades de congelamiento y descongelamiento de las células. Para congelar las células los protocolos más exitosos bajan la temperatura lentamente hasta los -70°C evitando de esta manera la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar a las células. Cuando la temperatura se baja bruscamente la velocidad de formación de cristales intracelulares se incrementa y la viabilidad decae en forma considerable. En la preparación se incluye, además, un agente que limita la cristalización, como el dimetil sulfóxido (DMSO). Para el descongelado en cambio, se incrementa abruptamente la temperatura para evitar que las células sufran grandes cambios de volumen y estallen.

Objetivo

Realizar un pasaje o repique de una línea celular creciendo en monocapa para su criopreservación.

Materiales

Reactivos de cultivo

- D-MEM (Medio Esencial Mínimo Modificado)
- Medio de congelación: SFB + DMSO
- Tripsina + EDTA
- PBS (Buffer Fosfato Salino)

Materiales generales

- Pipetas de vidrio estériles (2, 5 y 10 ml)
- Descarte
- Tubos cónicos de 15 ml estériles
- Propipeta automática
- Crioviajes de 1 mL

Desarrollo de la práctica

Los alumnos recibirán un frasco T25 con células creciendo en monocapa a una confluencia $\sim 70\%$. Se utilizarán células de carcinoma mamario murino F3II (Alonso et al, 1996).

Protocolo de congelación

1. Idem protocolo de repique anterior hasta el paso 11 inclusive (hasta el recuento de células con azul tripán)

2. Centrifugar 10 minutos a 800 rpm.
3. Preparar el medio de congelación: 10% DMSO +90% SFB en ausencia de células.
4. Llevar la suspensión celular a una concentración de $2-4 \times 10^6$ cél/ml.
5. Resuspender el pellet celular en la solución de congelación. Tener en cuenta la concentración de células al efectuar la dilución.
6. Fraccionar, llenando las criovial sólo hasta $\frac{3}{4}$ del volumen total de ésta. Siempre debe quedar una cámara de aire.
7. Cerrar herméticamente.
8. Rotular: línea celular, pasaje, Nro. de células y fecha (con lápiz)
9. Colocar los crioviales en el Mr. Frosty (un recipiente especialmente diseñado que emplea alcohol isopropílico y baja la temperatura 1°C grado por minuto al colocarlo en el congelador a -70°C).
10. Trasladar los crioviales a nitrógeno líquido cuando lleguen a -70°C .

Protocolo de descongelación

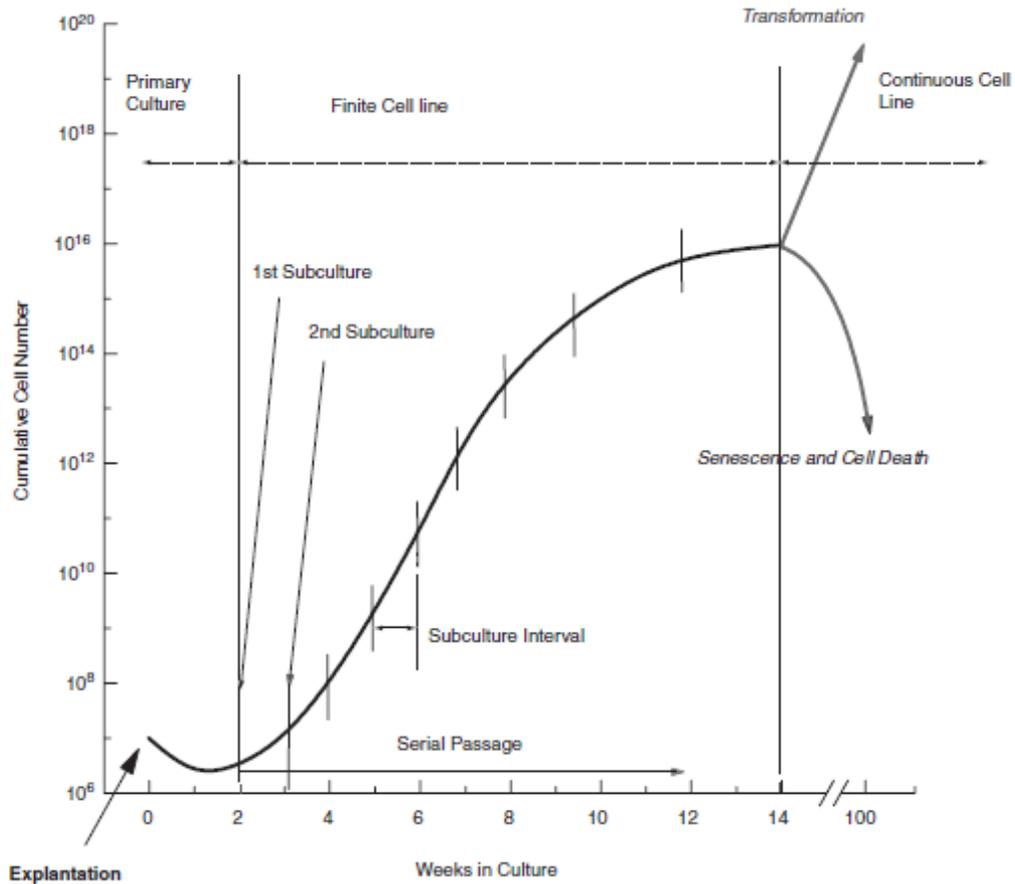
1. Sacar la ampolla de nitrógeno líquido rápidamente y sumergirla en un recipiente con agua a $37-38^\circ\text{C}$. Tapar el recipiente y agitar suavemente hasta descongelar.
2. Limpiar la ampolla con un algodón embebido en alcohol 70°C .
3. Abrir la ampolla en el la cabina de seguridad evitando su contaminación.
4. Con una micropipeta recoger el contenido y trasladarlo al tubo de centrífuga.
5. Diluir las células con D-MEM solo, 10 veces (Resuspender el contenido del criotubo en 9 ml de MEM, se busca disminuir al 1% el DMSO y el SFB queda alrededor del 10%)
6. Sembrar en frasco de 25 cm²
7. Rotular, indicando fecha y hora de descongelación.
8. 4-6 horas después, cambiar con sumo cuidado el medio y agregar medio de crecimiento (D-MEM y SFB 5%).

Problema 1

Una línea celular alienígena (GAFG) presenta un TD = 2 hs; el porcentaje de adhesión al plástico es del 90% y su densidad de saturación es 1×10^6 cél/cm² . A Ud. La entregan un frasco de 25 cm² confluyente. Realizar los cálculos necesarios para expandir esta línea en 4 frascos de 25 cm² en el menor tiempo posible. Enumerar todos los pasos a seguir en el repique teniendo en cuenta que los requerimientos de la línea son los siguientes: SFT (Suero Fetal de Tiburón) al 2% en MEA (Medio Esencial Alienígena). Volumen final: 5 ml

Preguntas:

- 1) Considerando el siguiente gráfico, en que momento del cultivo celular cree Ud. que realizo el repique de la monocapa de F3II?



2) Cual es el criterio que se debe tener para decidir en qué momento realizar el repique?

3) Porque en el repique del práctico se utiliza PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} ?

4) Para que se utiliza el EDTA?

5) Enumere los efectos tóxicos a nivel molecular del DMSO.

6) Cual es la función de SFB en el mantenimiento de líneas celulares? Y en el tubo falcon de 15 ml antes de centrifugar las células?

7) Idealmente, en cuanto tiempo tardaría en llegar el criovial a -70°C ?

- Sin embargo, teniendo en cuenta el siguiente gráfico. Cuanto tiempo esperarías Ud. como mínimo para poder pasarlo al tanque de nitrógeno?

COOLING RATES

