



Biología Celular y Molecular

Guía de TP Nro. 4

Ensayos de proliferación, adhesión y migración celular *in vitro*.

Introducción

La valoración de la proliferación celular y la citotoxicidad *in vitro* es, muchas veces, la primera aproximación que el investigador tiene cuando se propone testear los efectos de una droga sobre un tipo celular. Los ensayos desarrollados para medir estos parámetros 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 primeros datos dan una buena idea al investigador sobre qué tipo de respuesta podría esperar de la droga al utilizarla *in vivo*.

La adhesión y la migración son comportamientos celulares que pueden ser medidos *in vitro* utilizando ensayos relativamente simples. La adhesión celular es el proceso por el cual la célula se ancla a un sustrato. Para ello utiliza varios tipos de proteínas y otros componentes de membrana, como las integrinas y los glucolípidos.

En la migración interviene primordialmente los filamentos de actina para poder generar prolongaciones celulares, filopodios, lamelipodios y pseudópodos, encargadas de ser el flanco de avance celular. Así, gracias a la utilización de estas prolongaciones la célula puede desplazarse sobre el sustrato. Estos dos últimos comportamientos se ven bien representados en los macrófagos. Estas células dependen fuertemente de los procesos de adhesión y de migración para su correcto accionar dentro del organismo. Un macrófago estimulado tiene la capacidad de adherirse al endotelio y extravasarse, atravesando la membrana basal, migrando entonces hacia la zona extravascular.

Objetivos

Determinar el efecto del SFB sobre los fenómenos de proliferación, adhesión y migración celular utilizando la línea celular F3II.

Desarrollo de la práctica

Cada grupo recibirá un frasco T25 confluyente de células F3II derivada de un carcinoma mamario murino como materia prima para la práctica. Utilizando los conocimientos adquiridos en el TP Nro. 2 el alumno deberá repicar, contar las células del frasco y preparar una suspensión celular para utilizarla en los ensayos posteriores de proliferación y adhesión.

1. Proliferación celular

En este caso se revelará el ensayo de proliferación celular realizando una tinción con un colorante, como la toluidina.

1ra parte-Día 1

1. Preparar 10 ml de medio de cultivo MEM, con una concentración celular 10.000 cel/ml
2. Dividir el medio en 3 tubos con 2 ml c/u.
3. Rotular los tubos con la concentración de suero correspondiente (1, 5 y 10%)
4. Agregar a los tubos el suero para conseguir las concentraciones de suero 1, 5 y 10%.
5. Sembrar la placa de 96 wells con 200 µl de la suspensión celular antes preparada. Cada condición va a ser sembrada en una columna completa, logrando un n=8 por cada condición.
6. Se deja incubar 48 hs en estufa a 37°C con una atmósfera de 0,5% CO₂.

2da parte-Día 2

1. Pasado el tiempo de incubación, fijar las células con 0,2 ml de formalina al 10% durante 15 min.
2. Descartar la formalina y agregar 0,2 ml de toluidina 0,5% dejando actuar por 15 min.
3. Descartar la Toluidina y relizar dos lavados con 0,5 ml de PBS para retirar el colorante inespecífico.
4. Solubilizar las células en 2 ml de SDS 1%.
5. Leer la absorbancia en un lector multiplaca a 595 nm.

2. Ensayo de proliferación celular

1. Preparar 10 ml de D-MEM con una concentración celular de 250.000 cel/ml
2. Dividir esta suspensión en tres tubos de forma tal que al agregarle el suero quede cada tubo con las concentraciones de 0%, 1% y 10% respectivamente en un volumen final de 3 ml.
3. Rotular los tubos con la concentración de SFB indicada.
4. Sembrar placa de 96 well un volumen de 0,2 ml / well.
5. Incubar en estufa durante 60 min según corresponda.
6. Lavar la monocapa con PBS.
7. Agregar 100 µl/well de metanol e incubar durante 10 minutos.

8. Agregar 100 μ l/well de cristal violeta 0.1% (en H₂O) e incubar durante 10 minutos, adicionar 100 μ l del reactivo a un well que no posee células y tratarlo a partir de este punto como al resto.
9. Retirar el exceso de cristal violeta (MUY IMPORTANTE).
10. Lavar 3 veces con agua destilada para remover el exceso de cristal violeta.
11. Agregar 100 μ l de solución 10% metanol-5% Ácido acético glacial
12. Resuspender la solución
13. Leer a 570-595 nm.

3. Ensayo de migración celular

En este caso se utilizara el ensayo de la “herida” sobre una monocapa celular confluyente (*wound healing assay*).

1ra parte-Día 1

1. Observar la monocapa celular y verificar el grado de confluencia.
2. Retirar el medio de cultivo de los wells de la placa de 6 y agregar 2 ml de PBS.
3. Realizar dos “heridas” utilizando para esto un tip de P200 estéril, guiándose por la tapa de la placa, sin retirar el PBS, dejar espacio para realizar la última “herida” a la finalización del ensayo.
4. Una vez hecha la “herida”, lavar dos veces con PBS para descartar los restos celulares generados.
5. Agregar 2 ml / well de MEM mas el agregado de SFB, según corresponda.
6. Grupo 1 → Control
Grupo 2 → 1% SFB
Grupo 3 → 5% SFB
Grupo 4 → 10% SFB

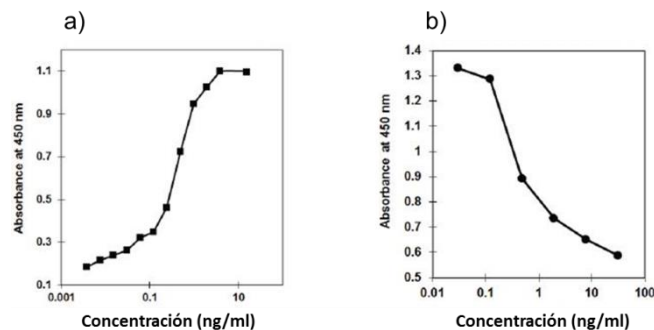
2da parte-Día 2

1. Las placas se incuban 48 hs en estufa gaseada a 37°C.
2. Una hora antes de terminar el ensayo realizar una “herida” que actúa como control.
3. Fijar en formalina 10% durante 30 min.
4. Teñir con azul de metileno al 10%, durante 30 min.

Problemas y Preguntas

1. Qué características tiene el plástico para que sea un buen sustrato de adhesión para las células?

2. En el ensayo de migración, porqué se realiza la herida una hora antes de la finalización del ensayo?
3. Para cada ensayo realizado, qué resultado esperaría si las células se trataran con Taxol o Faloidina?
4. Cuál es el racional de tiempos de incubación de cada uno de los ensayos? Explique
5. Tiene sentido realizar el ensayo de proliferación con una condición de 0% de SFB? Por qué? Y por qué en migración lo realizamos de esta manera?
6. Si quisiera evaluar el efecto de un extracto de aloe vera sobre estos tres fenómenos celulares. Como diseñaría los experimentos? Detalle en qué condiciones determinaría proliferación, adhesión y migración. Cuáles serían los controles?
7. Un seminarista está trabajando con una línea celular nueva y debe determinar el efecto de dos compuestos novedosos sintetizados. Decide realizar el ensayo sembrando 2500 cel/well en una placa de 96 wells en medio RPMI con 10% de SFB y luego de 72 hs de incubación a 37°C en estufa con 5% de CO₂, tiñe a las células y mide su absorbancia a 450 nm obteniendo los siguientes gráficos:



- a. Cuál de los dos compuestos parece actuar como un factor de crecimiento? Como llega a esa conclusión?
- b. Con respecto al grafico a, como es posible que las dos últimas concentraciones muestren valores de absorbancia similares si son concentraciones crecientes?
- c. Como al seminarista necesitaba encontrar un inhibidor de la proliferación, eligió trabajar el compuesto correspondiente al gráfico (completar). Para ello tuvo que calcular la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del compuesto. A simple vista, cual es la IC₅₀ del compuesto en cuestión?