



## Biología Celular y Molecular.

### Guía de TP Nro. 3

## 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.

## Desarrollo de la práctica

En este trabajo práctico, el alumno se familiarizará con técnicas para valorar la proliferación, la migración y la adhesión de células cultivadas *in vitro* en respuesta al suero fetal bovino (SFB), un estimulador usado generalmente en el cultivo de líneas celulares.

### Repique y recuento celular

Cada grupo recibirá una placa de 60 mm de diámetro 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.

### Proliferación celular

El ensayo de proliferación celular se realizará para evaluar la capacidad mitogénica que induce el suero fetal bovino (SFB) sobre células eucariontes.

### Protocolo - 1<sup>era</sup> parte

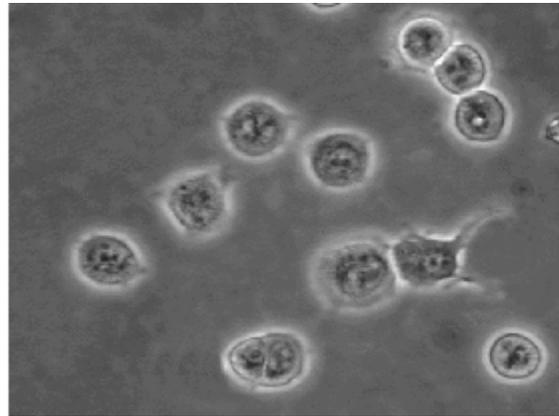
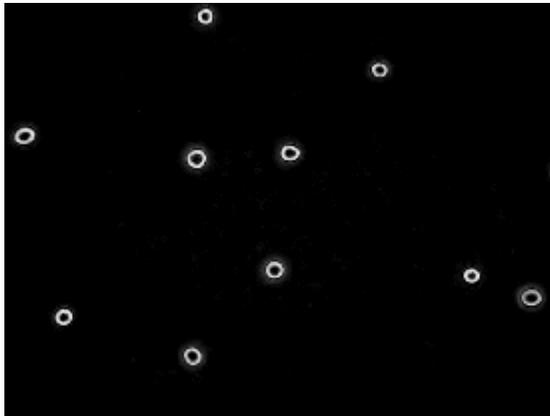
- 1) Preparar 18 ml de medio de cultivo MEM, 1% Gln, con una concentración celular 50.000 cel / ml.
- 2) Dividir el medio en 6 tubos con 3 ml c/u
- 3) Rotular los tubos con la concentración de suero correspondiente
- 4) Agregar a los tubos el suero para conseguir la concentraciones de suero 0, 2, 4, 6, 8 y 10%.
- 5) Sembrar una placa de 24 wells con 0,5 ml / well, según:

<b>Grupo 1</b>	Control 0% SFB	2% SFB	4% SFB	6% SFB	8% SFB	10% SFB
	Control 0% SFB	2% SFB	4% SFB	6% SFB	8% SFB	10% SFB
<b>Grupo 2</b>	Control 0% SFB	2% SFB	4% SFB	6% SFB	8% SFB	10% SFB
	Control 0% SFB	2% SFB	4% SFB	6% SFB	8% SFB	10% SFB

2<sup>da</sup> parte



- 8) Agregar 100 ul/well de metanol e incubar durante 10
- 9) Agregar 100 ul/well de cristal violeta 0.1% (en H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) e incubar durante 10 minutos, adicionar 100 ul del reactivo a un well que no posee células y tratarlo a partir de este punto como al resto
- 10) Retirar el exceso de cristal violeta
- 11) Lavar 3 veces con agua destilada para remover el exceso de cristal violeta.
- 12) Agregar 60 ul de solución 10% metanol-5% Ácido acético glacial
- 13) Resuspender la solución
- 14) Leer a 570-595λ.



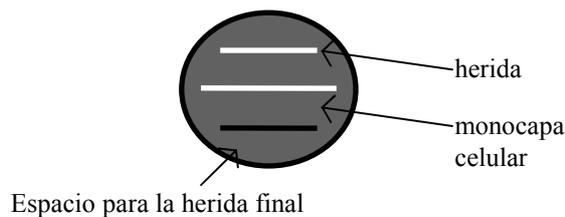
Células F3II a los 60 minutos de la siembra en placa plástica (izquierda), Células F3II a los 240 minutos (derecha); se puede observar como las células se encuentran haciendo spreading sobre el sustrato plástico.

## Ensayo de migración

Se evaluará el efecto del SFB sobre la migración celular de células eucariontes. Para ello se realizara el ensayo de la “herida” sobre una monocapa celular confluyente.

### Protocolo - 1<sup>era</sup> parte

- 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 una regla flameada, sin retirar el PBS, dejar espacio para realizar la ultima “herida” a la finalización del ensayo.

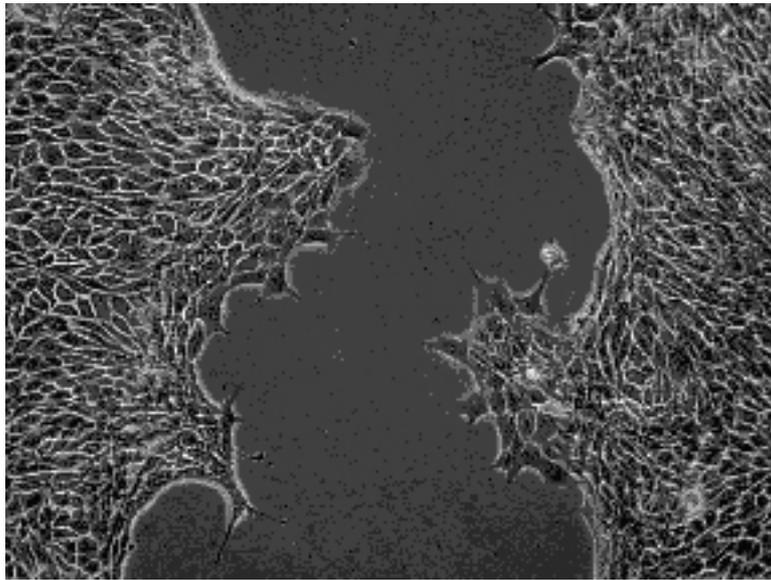


- 4) Una vez hecha la “herida”, lavar dos veces con PBS para descartar los restos celulares generados.
- 5) Agregar 2 ml / well de MEM y 1% Gln mas el agregado de SFB 2%, según corresponda.

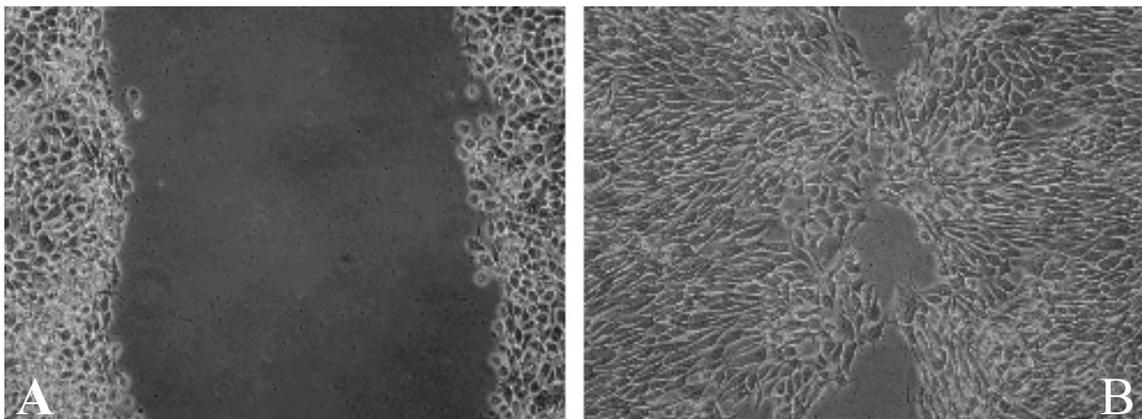
<b>Grupo 1 Control</b>			
<b>Grupo 2 5% SFB</b>			
<b>Grupo 3 Control</b>			
<b>Grupo 4 5% SFB</b>			

## 2<sup>da</sup>. parte

- 6) Las placas se incuban 48 hs en estufa gaseada a 37 °C.
- 7) Una hora antes de terminar el ensayo realizar una “herida” que actúa como control.
- 8) Fijar en formalina 10% durante 30 min.
- 9) Teñir con azul de metileno al 10%, durante 30 min
- 10) Contar las células que migraron hacia la luz de la “herida” utilizando la cuadrícula.



Frentes de migración avanzando hacia la herida realizada en el ensayo de migración (wound assay) sobre células F3II.



A. Imagen de la raya control, B, imagen de las células F3II luego de 15 horas de incubación.

## Ejercicios

## Ensayo de proliferación

El crecimiento de un cultivo celular puede representarse mediante la fórmula:

$$N_o = N_f / 2^{N_d}$$

**No:** Nro. de células inicial

**Nf:** Nro. de células final

**Nd:** Nro de duplicaciones :

**t/td**

Así, el número de duplicaciones que sufre el cultivo en las condiciones experimentales estudiadas se calcula como:

$$N_d = \log_{10} ( N_f/N_o ) \times 3.333$$

Se realizó una curva de calibración entre recuento celular y crecimiento celular por el método de Toluidina, dando los resultados que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Absorbancia	Nro de células
0,09	14926
0,086	24580
0,19	85875
0,379	205000
0,60	350000

Utilizando la información obtenida en el práctico, calcular el tiempo de duplicación con 0, 2, 4, 6, 8 y 10% de SFB para las células F3II.

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

En el ensayo de migración, porqué se realiza la herida una hora antes de la finalización del ensayo?

Para cada ensayo realizado, qué resultado esperaría si las células se trataran con Taxol o Faloidina?

Teniendo en cuenta el dato menor y mayor de absorbancia y recuento celular en la tabla de correlación (Tabla 1). Calcule el número de veces que aumenta en cada caso (Valor final / Valor inicial). Porque se obtienen valores distintos en cada caso? Cómo explica esta diferencia?