

Tópicos en Biofísica Molecular

2do Cuatrimestre de 2013

Docentes: Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

Práctica de laboratorio n° 3: Cultivo Celular y transfección

OBJETIVOS

Familiarizarse con el cultivo de líneas celulares, su mantenimiento y división. Analizar cultivos con diferentes grados de confluencia. Utilizar la cámara de Neubauer para el recuento de células. Preparar una placa de cantidad de células conocidas a partir del cultivo provisto.

Realizar la transfección transiente de la línea celular HC11 con vectores de fusión para la expresión de distintas proteínas de interés unidas a proteínas fluorescentes.

INTRODUCCIÓN

1. Cultivos celulares

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento. Cuando los experimentos se realizan con cultivos celulares, se los denomina ensayos “*in vitro*” (“en vidrio”), para diferenciarlos de aquellos que se llevan a cabo en organismos completos, o experimentos “*in vivo*” (“en organismo viviente”).

Los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células que forman parte de tejidos no pueden vivir en suspensión, y requieren una superficie sólida sobre la cual crecer y multiplicarse. Este soporte generalmente es la base de una placa o frasco de plástico, aunque a veces los requerimientos son más complejos y el plástico debe antes recubrirse con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, y con la cual interactúan), como por ejemplo el colágeno y la fibronectina.

Cultivos primarios

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios (**Figura 1**).

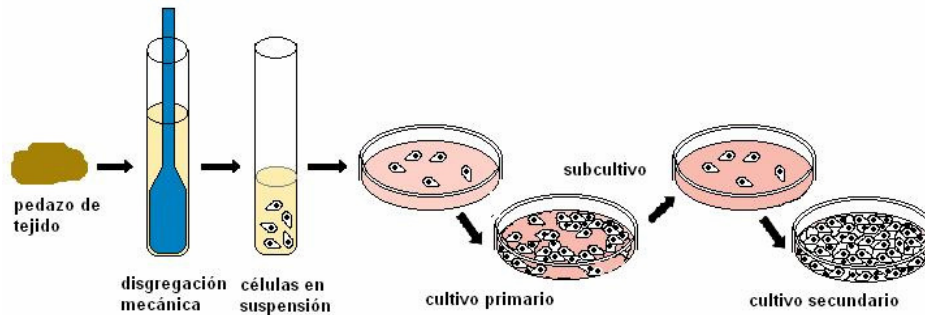


Figura 1. Esquema cultivo celular: cultivo primario y cultivo secundario.

Cultivos secundarios

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo (confluencia), formando una monocapa (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto (**Figura 2**). Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos.

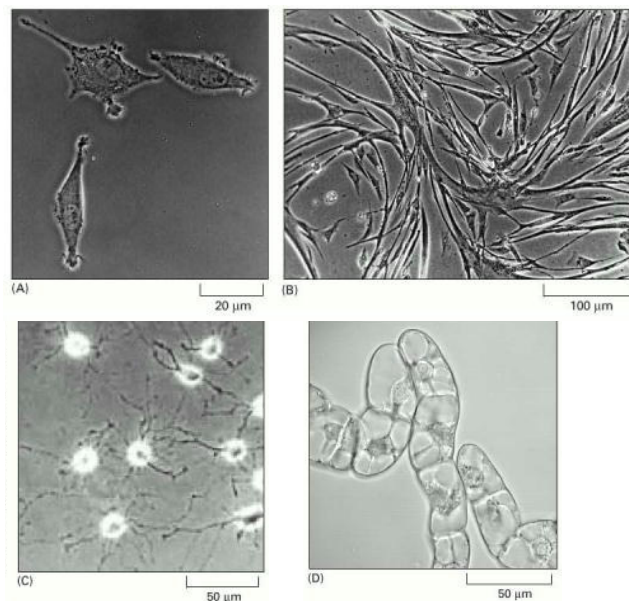


Figura 2. Células en cultivo. **(a)** Micrografías de contraste de fase de fibroblastos en cultivo. **(b)** Micrografías de mioblastos en cultivo mostrando las células fusionadas para formar células musculares multinucleadas. **(c)** Células precursoras de oligodendrocitos en cultivo. **(d)** Células de tabaco en cultivo.

Cultivos continuos o líneas celulares

La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse luego de un determinado número de divisiones en cultivo, por un proceso llamado senescencia celular. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse. La capacidad limitada de proliferación puede ser el resultado de un acortamiento progresivo de los telómeros (porción de ADN que se encuentra en los extremos de los cromosomas), o puede ser una consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (check points) del ciclo celular.

No todas las células humanas se immortalizan de la misma manera. A los fibroblastos humanos se los puede forzar a proliferar indefinidamente si se les provee el gen que codifica para la telomerasa. Otras requieren para immortalizarlas que se logre la inactivación de los check-points. Una forma de hacerlo es introducir ciertos “oncogenes” (genes promotores del cáncer) que pueden obtenerse de virus que causan cáncer, como algunas cepas del virus del papiloma humano, adenovirus, etc.

Las líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a -196 °C) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación.

Algunas de las líneas celulares más utilizadas se presentan en la **Tabla 1**.

LINEA CELULAR	TIPO Y ORIGEN
3T3	Fibroblastos (ratón)
BHK21	Fibroblastos (Syrian hamster)
MDCK	Célula epitelial (perro)
HeLa	Célula epitelial (humano)
PtK1	Célula epitelial (rata canguro)
L6	Mioblasto (rata)
PC12	Célula cromafin (rata)
SP2	Célula plasmática (ratón)
COS	Hígado (mono)
293	Hígado (humano) transformado con adenovirus
CHO	Ovario (Chinese hamster)
R1	Embrionic stem cells (ratón)
E14,1	Embrionic stem cells (ratón)
H1, H9	Embrionic stem cells (humano)
S2	Macrophage-like cells (Drosophila)
BY2	Undifferentiated meristematic cells (tabaco)

Tabla 1. Líneas celulares: tipo y origen. Muchas de estas líneas celulares son derivadas de tumores.

Todas son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo, y expresar algunas de las características especiales de sus células de origen. Las líneas BHK21, HeLa y SP2 son capaces de crecer eficientemente en suspensión. La mayoría de las otras líneas celulares necesitan de un sustrato sólido para multiplicarse.

2. Medios de Cultivo

Para el cultivo celular se utilizan placas con medios líquidos que contienen pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación

celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas. Además, la mayoría de los medios incluyen una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino o equino, o extracto crudo de embriones de pollo. Dichos medios se utilizan en la actualidad para los cultivos de rutina (**Tabla 2**), y por lo tanto es difícil saber qué macromoléculas requiere un determinado tipo celular para funcionar y multiplicarse. Como consecuencia, se han desarrollado numerosos medios químicamente definidos, denominados “libres de suero”, que poseen, además de las pequeñas moléculas mencionadas, varias proteínas específicas necesarias para la supervivencia y proliferación, como los factores de crecimiento. Así, gracias a estudios que buscaban establecer las condiciones mínimas de cultivo para un comportamiento celular adecuado, se descubrieron muchas moléculas de señalización extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de determinados tipos celulares.

Los medios de cultivo son generalmente tamponados para mantener un pH alrededor de 7,4 y tienen, además, indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos como resultado del metabolismo celular. Suelen agregarse también antibióticos y antimicóticos para impedir la contaminación con microorganismos.

Los cultivos crecen usualmente en contenedores de plástico o vidrio con una superficie apropiada para la adhesión celular, y se mantienen en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire.

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros Compuestos *	Proteínas requeridas en medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	Na H ₂ PO ₄	Estreptomina	Factores de crecimiento
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Anfotericina	específicos
Isoleucina	Pantotenato	CaCl ₂	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl ₂	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

Tabla 2. Composición de medios de cultivo para células de mamífero. * La penicilina y la estreptomina son antibióticos y la anfotericina es un antimicótico, se adicionan para impedir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes, respectivamente. El rojo fenol es un indicador de pH.

3. Recipientes para el cultivo de células

Existen numerosos contenedores y recipientes para cultivar células y tejidos, dependiendo de las características de las células a cultivar y de la escala deseada.

Cuando se cultivan células para hacer experimentos, se hacen cultivos a pequeña escala. En esta escala, las células se multiplican en frascos que tienen una base de 25 a 175 cm²

(Figura 3). En un recipiente típico de 175cm^2 pueden obtenerse aproximadamente 10^7 células adheridas, y unas 10^8 células cuando se trata de líneas que crecen en suspensión. En las botellas de cultivo estándares no es posible producir cantidades mayores de células, dada la cantidad de tiempo insumida para los repetidos pasajes necesarios a medio fresco, la demanda de espacio en un incubador (que controla la composición de gases, la temperatura y la humedad del entorno) y el costo de los insumos.

Una vez que las células llegan a confluencia (forman una monocapa que cubre todo el recipiente de cultivo), el cultivo se divide en nuevos cultivos de menor cantidad de células que pueden seguir reproduciéndose. Para lograrlo, la muestra es tratada con diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz extracelular; y también se utilizan agentes (como el EDTA -ácido etilendiaminotetraacético-) que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene una suspensión celular de la cual se pueden hacer diluciones.



Figura 3. Distintos recipientes para cultivo de células. Tomado de http://www.dwscientific.co.uk/whitley_workstations.php

4. Recuento de células: cámara de Neubauer

En Biología Celular es común el encontrarse con la necesidad de conocer el número de células que presentes en un volumen dado; por ejemplo, cuando se realizan cultivos celulares se precisa saber cuantas células se encuentran en un momento con respecto al número de células que inicialmente se sembraron. En tales casos se requiere de un instrumento que permita contar directamente, o bien, calcular la concentración celular en un medio. Una alternativa resulta contar directamente el número de células presentes en un volumen conocido. Esto puede resultar un gran trabajo considerando el tamaño de algunas células, sin embargo, la **cámara de Neubauer** permite contar células de distintos tamaños de manera muy práctica.

La **cámara de Neubauer** tiene el tamaño de un portaobjetos grueso, y una de sus caras se encuentra grabada con dos cuadrículas muy finas y de medidas definidas (Figura 4), separadas una de otra por una ranura. El fondo de la cámara del campo central es usualmente $0,1\text{ mm}$ más bajo (= profundidad de la cámara) que ambos campos adyacentes. Entre campo central y cubreobjetos ya colocado existe por tanto una ranura de $0,1\text{ mm}$. La limitación lateral del volumen a contar se forma mediante las superficies imaginadas por la proyección vertical sobre las líneas exteriores de la cuadrícula de recuento.

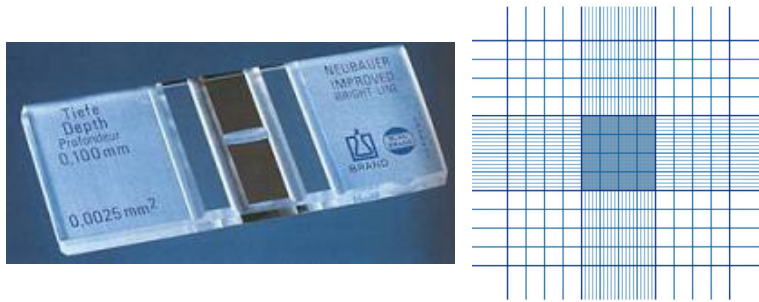


Figura 4. Cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de la cuadrícula utilizada para el recuento de células (derecha). Tomado de <http://dk.cryosinternational.com/clinics/products/counting-chamber.aspx>

De esta manera, es posible conocer el volumen de muestra celular que se coloca en la cámara, y sólo es necesario contar el número de células presentes en ese volumen. La concentración de la suspensión de células estará dada entonces por (1):

$$\text{células por u. de volumen} = \frac{\text{células contadas}}{\text{superficie contada} \cdot \text{profundidad de la cámara}} \quad (1)$$

5. Transfecciones transientes

La **transfección** se define como la introducción dentro de una célula eucariota de una molécula de DNA que no pertenece a la célula. Como resultado, la célula presenta en general un gen mutado además de su gen normal (en células haploides el gen puede ser reemplazado). Los organismos que han sido permanentemente modificados por la inserción, supresión o reemplazo de un gen se denominan organismos *transgénicos*. Cuando el gen normal continúa presente, solo se observan factores dominantes de la alteración en análisis fenotípicos. Aún así, los animales transgénicos con genes insertados han logrado importantes avances en cuanto a cómo se regulan los genes en mamíferos o cómo ciertos genes alterados (llamados oncogenes) causan el cáncer [1].

Las técnicas de transfección celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales. Los plásmidos (secuencias de DNA extracromosómico, presentes normalmente en bacterias) se utilizan como construcciones reporteras, dada su fácil manipulación para insertar nuevas secuencias genéticas.

Muchas veces puede ser de interés seleccionar las células que han adquirido el plásmido. Para facilitararlo se incluyen en estos plásmidos genes de resistencia a drogas que permiten a las células que los han adquirido sobrevivir en medios selectivos. Así, se pueden diferenciar las **transfecciones temporales o transientes** y las **transfecciones estables** o de larga duración.

Las técnicas de transfección que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: **métodos químicos** o **métodos físicos** [4].

Los **métodos químicos** están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica o a través de las membranas. Entre estos métodos podemos mencionar:

- **Método del fosfato cálcico.** Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares.
- **Método del DEAE dextrano.** Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las muy negativamente cargadas moléculas de DNA. El DNA acompañado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.
- **Método de lipofección.** Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA en el citosol. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe un consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método es, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

Los **métodos físicos** están basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Entre ellos están:

- **Microinyección directa.** El DNA se microinyecta directamente al citosol, célula por célula.
- **Electroporación.** Introducción del DNA mediante la permeabilización de la membrana celular por un campo eléctrico.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Cultivo celular

1.1 Reconocimiento del equipamiento y materiales necesarios para el cultivo: flujo laminar, estufa de cultivo, baño térmico, propipetas automáticas, placas y botellas de cultivo. Discusión de las pautas para el trabajo en esterilidad.

1.2 Observación de líneas celulares en cultivo, con distintos grados de confluencia. Analizaremos las líneas celulares HC11 (epiteliales mamarias de ratón) y HeLa (células de cáncer cervical humano).

1.3 Preparación de una suspensión de células mediante su incubación con tripsina.

1.4 Recuento de células utilizando la cámara de Neubauer.

1.5 Preparación de un subcultivo. Preparación de placas con una cantidad controlada de células.

2. Transfección

Se transfectará mediante el método de lipofección con lipofectamina (Lipofectamine 2000 de Invitrogen, lípidos especialmente diseñados para transfección de células eucariotas [5]). Trabajaremos con la línea celular HC11 (células epiteliales mamarias de ratón) y vectores de fusión para la expresión de:

- **LifeAct** unida a mCherry (marcado de filamentos de actina)
- **Zixina** unida a GFP (marcado de adhesiones focales)

La transfección se realiza sobre células crecidas en cubreobjetos para su visualización en el microscopio. Los cubreobjetos son previamente recubiertos con fibronectina (proteína de la matriz extracelular) para aumentar la adhesión de las células al vidrio y así mejorar su crecimiento.

Para que la transfección sea exitosa, el cultivo debe estar entre un 50% y un 90% de confluencia. Para cada línea celular es necesario estimar la cantidad de células que se deben plaquear para que al momento de la transfección el cultivo se encuentre en las condiciones mencionadas. El cultivo se realiza en placas de 6, 12 o 24 pocillos (P6, P12 o P24 respectivamente) según el tamaño de cubreobjetos que se va a utilizar.

Protocolo de transfección (placa P6, cubreobjetos de 25 mm)

Reactivos a utilizar:

- Solución de plásmido
- Medio Optimem (Invitrogen)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Medio RPMI solo (sin suero ni antibiótico)
- PBS

2.1 Sacar células de la estufa que vaciar el medio de cada pocillo. Lavar con PBS. Colocar 1ml de medio Optimem.

2.2 Preparar dos soluciones, en una vial cada una. Por cada pocillo (de la placa de 6 pocillos) hay que poner:

Mix L = 50ul Optimem + 4ul lipofectamina

Mix D = 50ul Optimem + 2 ug DNA

Notar que el volumen de solución de DNA a utilizar dependerá de la concentración de la solución. Las cantidades de lipofectamina y DNA dependen de la línea celular y del plásmido que se va a utilizar, estas cantidades fueron optimizadas para esta línea y estas soluciones de DNA.

2.3 Dejar mezclar por 5 minutos.

2.4 Mix L+D = volcar la mezcla de DNA en la de lipofectamina, tirando de a gotitas y agitando suavemente la vial para que se mezcle.

2.5 Esperar 30 minutos.

2.6 Con micropipeta tomar los **100ul de Mix L+D** y agregarlo al pocillo de a gotitas distribuidas en el cubreobjetos. Cerrar la placa y moverla en ambas direcciones para que se distribuya bien la mezcla.

2.7 Dejar en la estufa por 2 horas.

2.8 Pasadas las 8 horas, sacar el medio de transfección, lavar con PBS y agregar medio completo.

2.9 Observar al microscopio luego de pasadas 36 horas, para que la proteína se exprese en la célula.

REFERENCIAS

[1] *Molecular Biology of The Cell*. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Publisher: Garland Publishing Inc.

[2] *Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)*. Lic. María Eugenia Segretín. INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyc, FCEyN-UBA

[3] http://www.brand.de/fileadmin/user/images/products/Clinical_Lab/Counting_Chambers/counting-s.pdf

[4] *Cultek* Nota Técnica: Transfección. 15 de julio de 2006.
(http://www.cultek.com/inf/otros/Notas_tecnicas/transfeccion.pdf).

[5] Hoja de datos Lipofectamine 2000, Invitrogen.
(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf)