

Iniciación a la experimentación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular, Genética y Evolutiva

Tema 3. Técnicas de Biología Celular que permiten el análisis de la función de una proteína



OCW
OpenCourseWare



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

NAZIOARTEKO BIKAINASUN CAMPUSA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

- Existen varias técnicas de Biología Celular que permiten realizar ensayos funcionales.
- En este tema vamos a presentar tres herramientas celulares que pueden ser especialmente útiles para la experimentación que se ha planteado en este curso:
 1. **El cultivo "in vitro"**: una técnica básica y fundamental en Biología Celular; en concreto, para cumplir con los objetivos planteados en esta experimentación, resulta especialmente relevante el cultivo de melanocitos.
 2. **Inmunohistoquímica**: permite detectar proteínas en su posición nativa dentro de la célula.
 3. **Cuantificación de productos sintetizados por la células**. Para el estudio del caso es relevante la cuantificación de la **melanina**.



1. Cultivo “in vitro”

- El cultivo “*in vitro*” es una técnica básica para cualquier tipo de experimentación que requiera el mantenimiento y la proliferación de células en condiciones experimentales controladas.
- Aunque el cultivo *in vitro* puede referirse a microorganismos, células de plantas y células de animales, en la práctica habitualmente nos referimos como cultivo celular a las condiciones que permiten el mantenimiento y la proliferación de células animales.



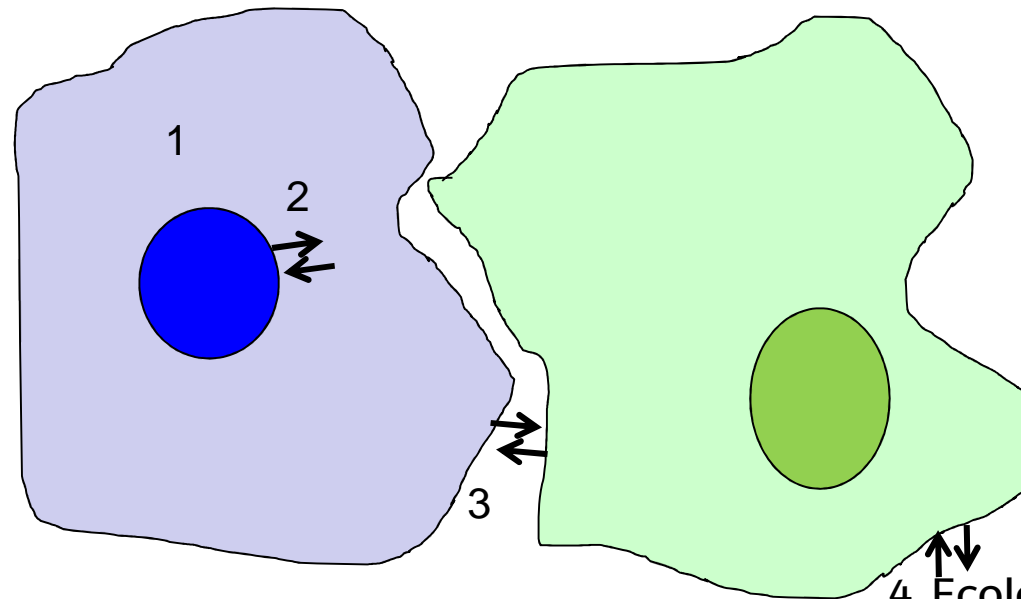
Aplicaciones de los cultivos celulares

La utilización de cultivos celulares es una herramienta básica para el análisis en el ámbito de la investigación Molecular y Celular ya que permite abordar prácticamente cualquier proceso y función celular en condiciones controladas.

1. Actividad intracelular: transcripción DNA, síntesis de proteínas

2. Flujo intracelular: RNA, hormonas, metabolitos...

3. Interacciones: célula-célula, inducción embrionaria, cooperación celular, inhibición por contacto



4. Ecología: cinética de poblaciones, drogas...

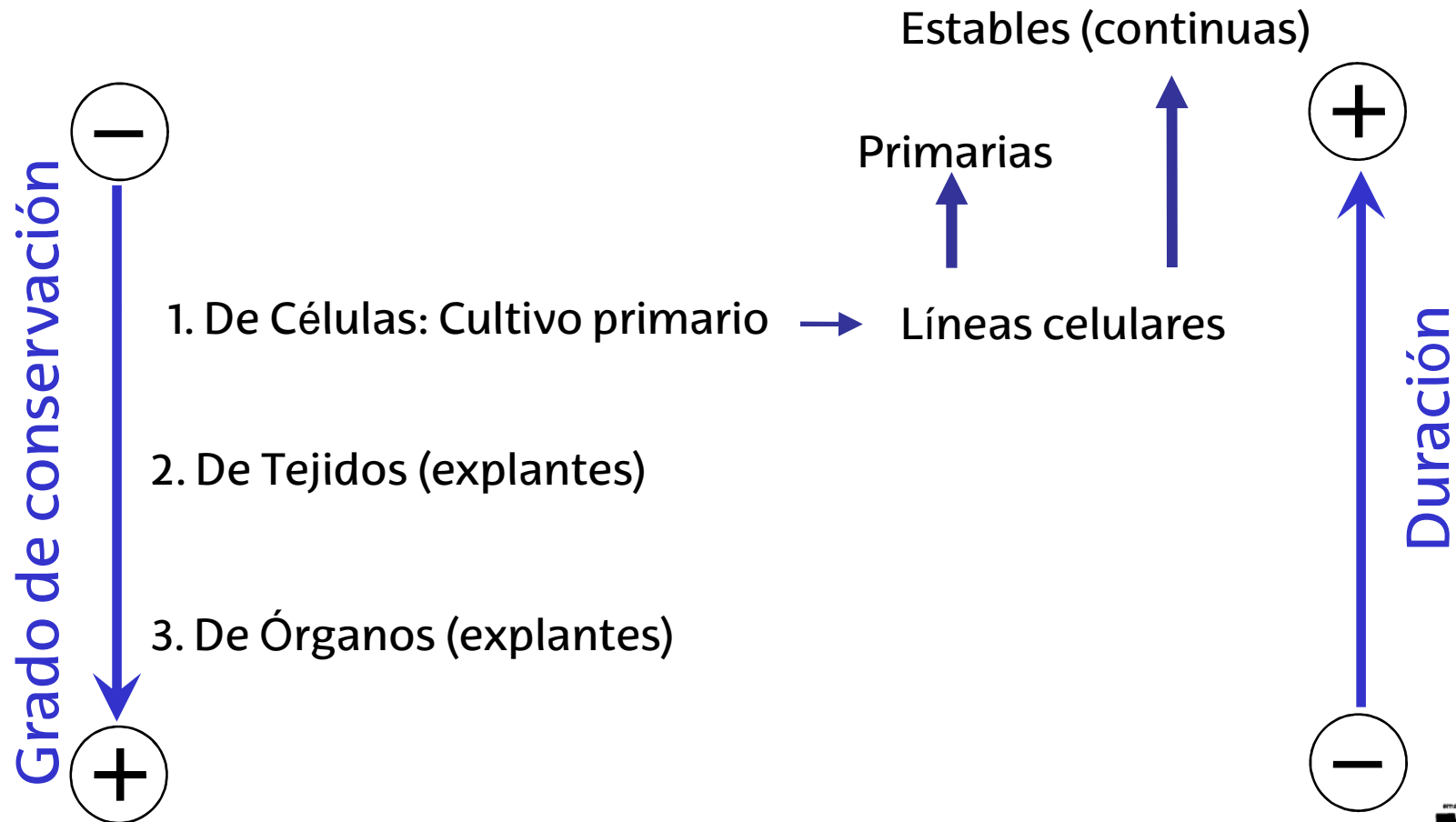


Definición de cultivo celular

- Se denomina cultivo “in vitro” a un conjunto de técnicas que permiten el **mantenimiento de células** fuera del organismo de procedencia, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, por un tiempo variable.
- Los cultivos se clasifican atendiendo a varios criterios:
 1. Grado de **conservación** de la estructura del tejido o del órgano de origen
 2. **Duración del cultivo**



Esquema de los tipos de cultivos

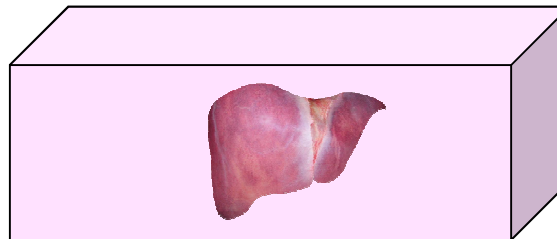


1. Dependiendo del **grado de conservación** de la estructura del tejido o del órgano de origen, los cultivos se clasifican en:
 - a) **Cultivo de órganos:** órgano completo o fragmentos de órganos.
 - b) **Cultivo de tejido (explantes):** fragmento de tejido o tejidos
 - c) **Cultivo celular:** células obtenidas del órgano antes o durante el cultivo.



a) Cultivo de órganos

- Se mantiene la arquitectura tridimensional tisular
- Se mantienen las interacciones celulares y por tanto la diferenciación celular
- Las células tienen una proliferación limitada, lo que impide su propagación; por ello, la reproducibilidad de los resultados es muy baja.

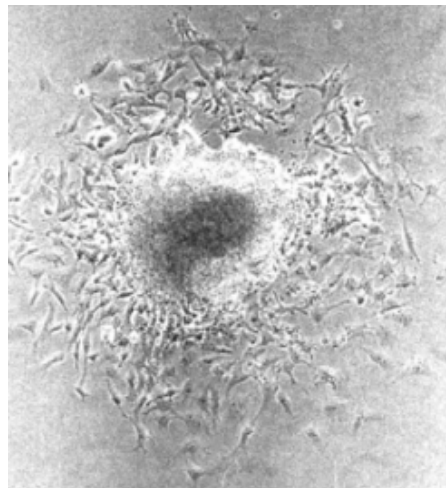


By Mikael Häggström - File:Human Hepar.jpg, Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=11657184>



b) Cultivo de tejidos (explantes)

Las células del interior de los tejidos que están en un cultivo, no pueden acceder a los nutrientes del medio y al cabo de un cierto tiempo mueren. Las células de la periferia proliferan y migran. Como consecuencia, este tipo de cultivo evoluciona hacia un cultivo celular



<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Humanstemcell.JPG/300px-Humanstemcell.JPG>



c) Cultivo celular

- Se origina mediante disgregación (enzimática o mecánica) de un tejido o por evolución de explantes
- Las células pueden estar adheridas al sustrato (cultivo adherente) o en suspensión
- Las células proliferan llegando a ocupar toda la superficie del recipiente, por lo que se pueden propagar.
- Suele estar constituido por una población celular homogénea, que se llama línea celular
- Las líneas celulares pueden ser primarias o continuas (*Unchern, 1999*)

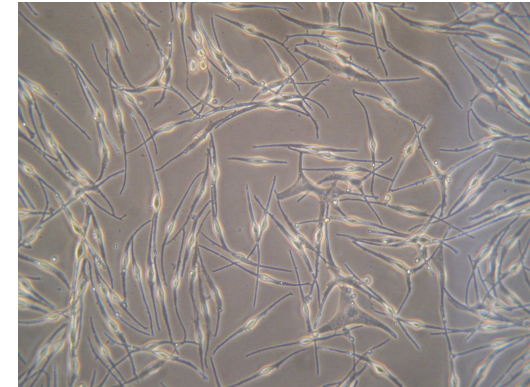


Imagen propia



2. Dependiendo de su **duración** se distinguen distintos tipos de cultivos:

- a) **Cultivo primario:** células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo cuya viabilidad tiene un período de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo.
- b) **Líneas celulares:** cultivo de células homogéneas, obtenidas por subcultivos sucesivos a partir un cultivo primario. Estas a su vez se pueden diferenciar en:
- **Línea celular primaria:** estas células tienen un poder de proliferación limitado: tras un número de divisiones celulares, entran en senescencia y mueren. Tienen vida finita.
 - **Línea celular continua o estable:** estas células tienen un poder de proliferación ilimitado, no pierden su capacidad de división celular. Son células "inmortales", tienen vida infinita.



Cultivo primario y línea celular

Cultivo primario: constituido por células derivadas directamente de un órgano o tejido (proliferan)

Recolecta y resiembra (subcultivo/pase)

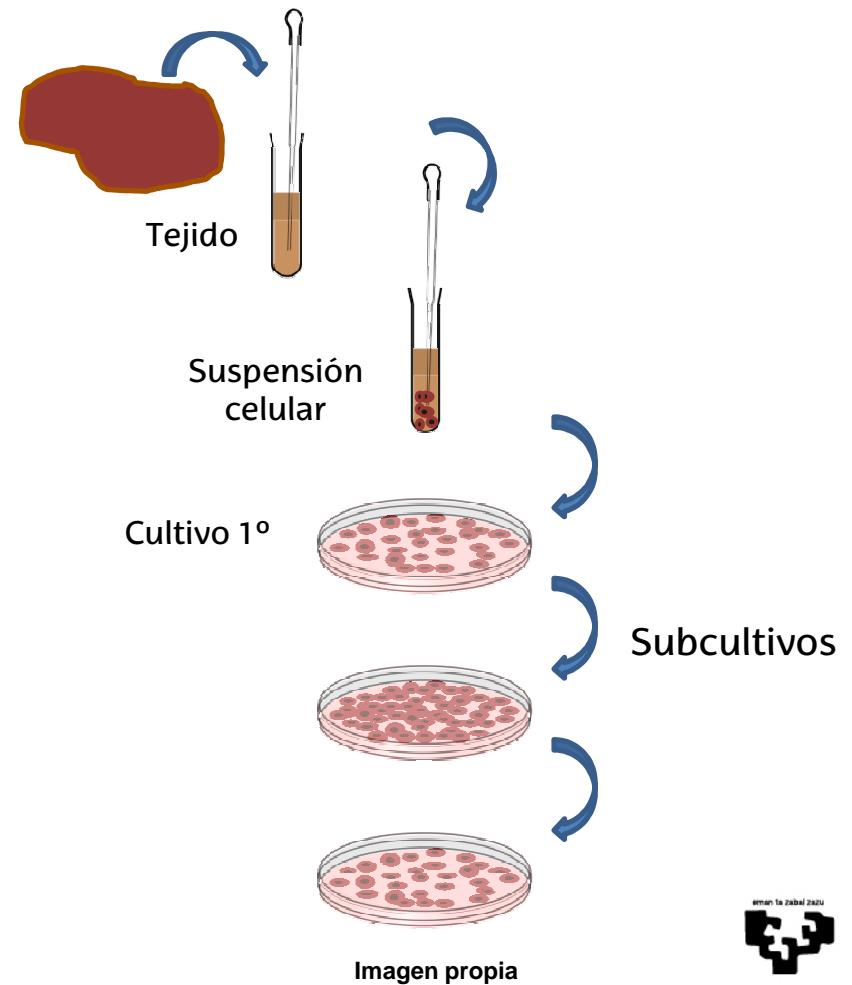
Cultivos seriados

Predominio de un tipo celular

Línea celular

- Primaria
- Continua

Origen de una línea celular



Mantenimiento de los cultivos celulares

- Los cultivos celulares se disponen en recipientes, habitualmente de **vidrio o plástico**, en un medio líquido que aporta los nutrientes esenciales para la supervivencia y crecimiento.
- La **composición del medio** es variable, pero habitualmente contienen elementos esenciales básicos: solución salina tamponada, aminoácidos, vitaminas, glucosa y oligoelementos.
- El medio basal se complementa con hormonas o **factores de crecimiento** específicos, en los medios definidos, o suero de distinto origen (bovino fetal, de ternera..) en aquellos no definidos.
- Además, se suele añadir **antibióticos** de amplio espectro (penicilina/estreptomicina) y antifúngicos (fungizona, anfotericina-B) con el objetivo de evitar contaminaciones.
- Los recipientes de los cultivos se mantienen en el interior de **incubadores** para mantener las condiciones físicas adecuadas: temperatura, humedad y aporte de CO₂.



Imagen propia



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Binder_CB_210_incubator_interior.jpg



Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

1.- Obtención de células para siembra

La mayoría de líneas celulares que crecen adheridas a plástico sufren una parada en su crecimiento a densidades elevadas, impuesta por el proceso de inhibición por contacto. Dependiendo de la morfología y propiedades de cada línea, las células dejan de dividirse, bien cuando ocupan toda la superficie de la placa, o bien cuando todas están en contacto con otras (sin necesidad de cubrir completamente el plástico). A esta situación (o densidad) se le denomina **confluencia del cultivo**.

No se debe dejar un cultivo en confluencia por periodos prolongados. Es conveniente reducir la densidad de células en cada momento, para permitir su crecimiento de forma continuada.



Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

2.- Subcultivos

El **subcultivo** o pase permite aumentar el número de células con las que se puede trabajar ya que se recolectan las células y se resiembran en más frascos.

- a) Si se quiere mantener la línea dividiéndose en una superficie igual a la usada hasta entonces, se descartarán parte de las células
- b) si lo que se pretende es expandir el cultivo para aumentar el número total de células, se distribuirán todas las disponibles en un número mayor de placas.

En cualquiera de los dos casos, la densidad de células se reduce en un porcentaje que varía para cada línea y que suele ser desde un 80% a un 90% (pase 1/5 o 1/10, respectivamente).



Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

3.- Recolecta o tripsinización

Antes de manipular las células, se debe comprobar el aspecto de las células con el microscopio invertido de contraste de fases.

Si se trata de células que se adhieren al soporte, para su separación se utiliza una solución enzimática (como la tripsina) o un quelante del calcio (como el EDTA); ambos productos deshacen las uniones de las células al soporte, así como las uniones entre las células. Este proceso debe realizarse con cuidado, ya que la tripsina también es capaz de destruir las células por digestión total.

Cuando las células se han separado, se añade al recipiente de cultivo un medio con suero. En el suero hay moléculas que inhiben la tripsina, deteniéndose la reacción e impidiendo así la destrucción celular.



Procedimiento de recolecta

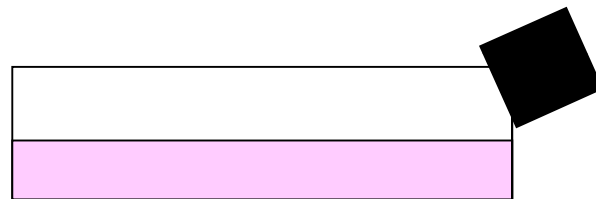


Imagen propia

- Decantar el medio
- Añadir solución tripsina/EDTA
- Incubar 5´ a 37°C
- Observar al microscopio
- Añadir medio
- Recoger en tubo de 15ml
- Centrifugar 1500 rpm, 5´
- Descartar el sobrenadante
- Añadir medio y resuspender

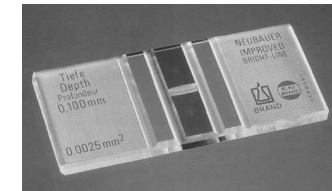


Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

4.- Contaje y análisis de viabilidad celular en cámara cuenta glóbulos *Neubauer*

Para determinar la densidad celular en una suspensión se pueden emplear diferentes técnicas. La más básica y la más habitualmente utilizada consiste en utilizar una cámara de contaje celular, por ejemplo, la cámara de Neubauer, y un microscopio.

La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado una cuadrícula como la que se aprecia en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación de 0.25 mm entre dos líneas consecutivas.

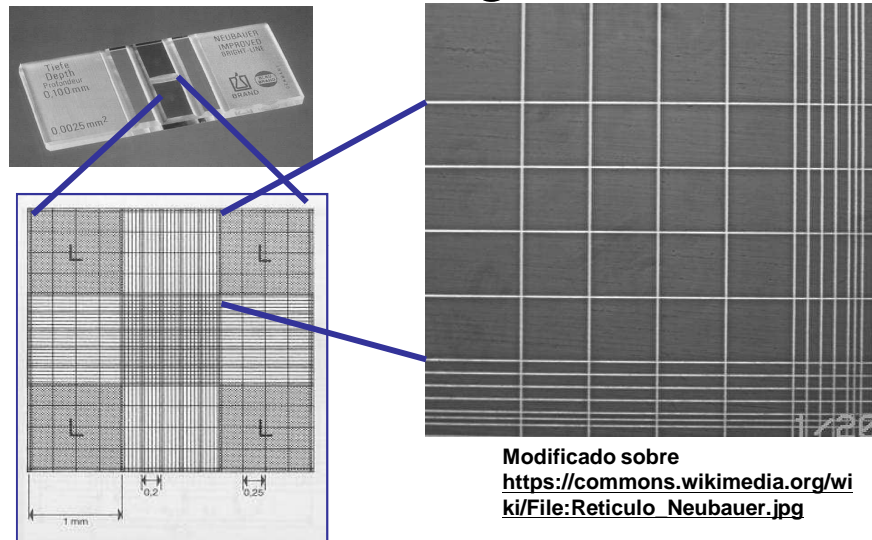


Modificado sobre
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg



Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

4a.- Contaje celular en cámara cuenta glóbulos Neubauer



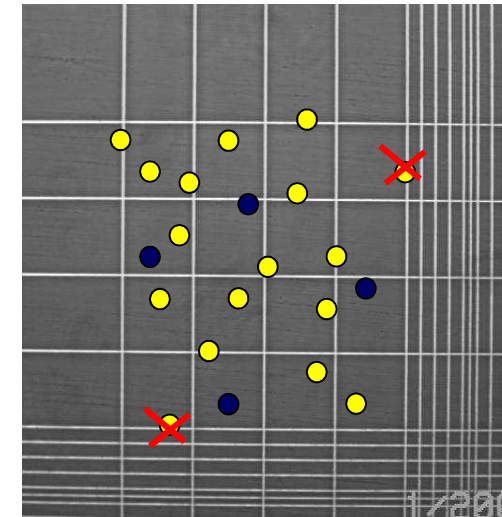
El área sombreada y marcada con L en la Figura, corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos, éste dista 0.1 milímetros de la superficie marcada y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetros cúbicos, es decir 0.1 microlitros.



Procedimientos básicos para el manejo de líneas celulares

4b.- Viabilidad celular en cámara cuenta glóbulos Neubauer

- Para determinar la viabilidad **celular** se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con **azul tripán**.
- El azul tripán es un coloide coloreado de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Por tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora, mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul.
- De este modo se determina la viabilidad celular, es decir, el número de células vivas respecto al número de células azules cuantificadas en la cámara de Neubauer.



- Células vivas
- Células muertas
- ✗ Las células situadas en el borde interno del cuadrado no se consideran



Procedimiento para el uso de la cámara Neubauer

- Se toma una muestra de la suspensión celular ($\pm 40 \mu\text{l}$) y se añade la misma cantidad (1:1) de Azul tripán (1%). Se mezclan las células con cuidado para asegurarse de la correcta disgregación.
- Se añade una gota de la solución diluida de células a la cámara de Neubauer.
- Se cuentan las células que hay en cada una de las cuatro zonas de la casilla 4x4
- Como el volumen de cada una de las zonas que se cuenta es $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ mm}^3$ ($0,1 \mu\text{l}$), **el número de células/ml** de la solución será: media del n° de células de las cuatro zonas $\times 10^4 \times 2$ (factor dilución)
- **Viabilidad** según la tinción con azul tripán: (células blancas/células totales) $\times 100 = \% \text{ viabilidad}$



Tutoriales sobre los cultivos celulares y su mantenimiento:

- Cell Culture Basics from Gibco [Internet]. Thermo Fisher Scientific [21 dic de 2011; citado el 25 oct. De 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=kbhQ29vRqs4>
- Passaging Cells: Gibco Cell Culture Basics Gibco [Internet]. Thermo Fisher [21 dic de 2011; citado el 25 oct. De 2016]. Disponible desde: https://www.youtube.com/watch?v=z_aK6pH3_G8



2. Inmunohistoquímica

- Las técnicas de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica son procedimientos basados en la especificidad de unión entre anticuerpos y antígenos.
- En la inmunohistoquímica se emplean **anticuerpos** que reconocen y se unen de manera específica a la molécula que se quiere identificar (antígeno). De esta forma es posible determinar la presencia y distribución de los antígenos en células y tejidos.
- Para que se pueda determinar la distribución de los antígenos en las células es esencial que se mantenga su morfología y que los sitios antigénicos estén accesibles. Las técnicas de fijación y de permeabilización resultan esenciales para ello.



Fijación celular

- La **fijación** celular juega cuatro papeles críticos en la inmunohistoquímica:
 - Estabilizar la morfología celular y la arquitectura del tejido
 - Desactivar las enzimas proteolíticas
 - Reforzar las muestras para soportar su procesamiento y tinción
 - Proteger las muestras contra la contaminación microbiana y la descomposición
- En inmunohistoquímica una fijación adecuada requiere no sólo una inmovilización rápida y total del antígeno, sino también una conservación suficiente de su inmunorreactividad y el mantenimiento de su accesibilidad a los reactivos inmunoquímicos para la localización
- Existen diferentes procedimientos químicos y físicos que se pueden aplicar a la fijación celular, si bien el fijador químico más ampliamente utilizado es el formaldehído, que muestra una amplia especificidad para la mayoría de objetivos celulares.



Permeabilización celular

- La permeabilización celular suele ser necesaria para detectar epítopos intracelulares y para proteínas de transmembrana.
- En estos casos, el anticuerpo requiere acceder al interior de la célula para detectar la proteína y para ello se requiere de algún procedimiento de permeabilización.
- Lo más habitual es utilizar como permeabilizantes compuestos tipo detergentes como tritón-X, tween, etc.



Interacción antígeno-anticuerpo

- La interacción (o reacción) **antígeno-anticuerpo** es una interacción química que ocurre entre anticuerpo y antígeno mediante enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, enlaces Van der Waals...).
- Hay una gran diversidad de anticuerpos y antígenos y el reconocimiento e interacción entre ambos se debe a la constitución química específica de cada anticuerpo.
- Los anticuerpos (inmunoglobulinas) son glicoproteínas producidos por linocitos B del sistema inmune, capaces de identificar y neutralizar sustancias que son ajenas o extrañas al organismo, tales como bacterias o virus (antígenos).



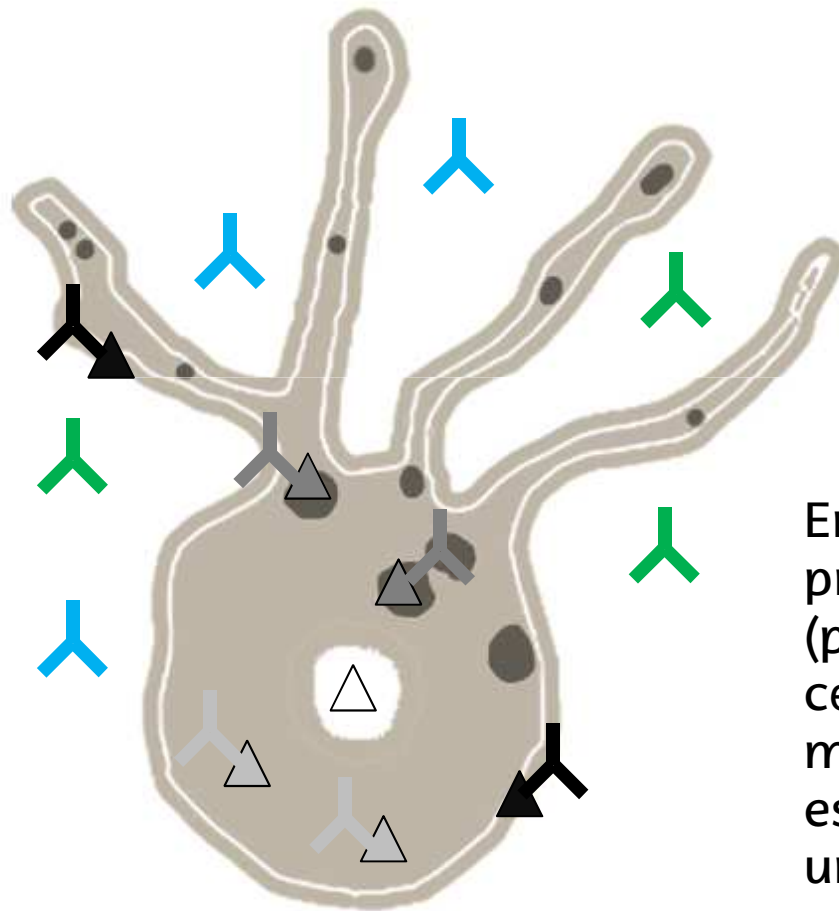
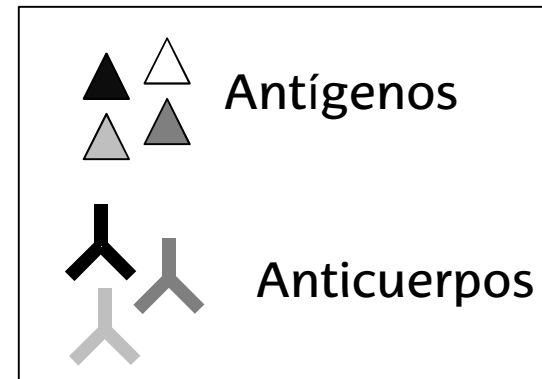


Imagen propia

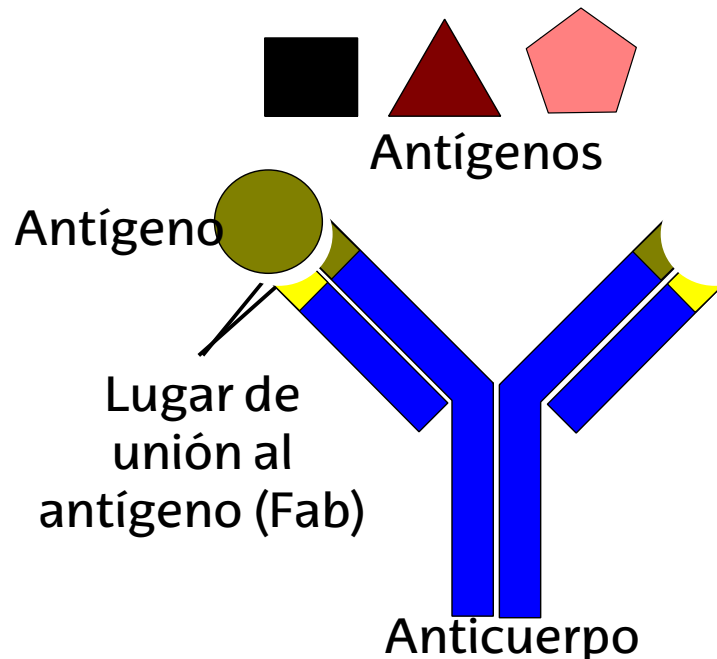


En el esquema se observa una célula que presenta diferentes antígenos (proteínas) en diferentes zonas de la célula (núcleo (blanco), citoplasma (gris), membrana (negro)...). Los anticuerpos específicos son capaces de reconocer y unirse a sus antígenos.



La Inmunoglobulina IgG

Dentro de la familia de las inmunoglobulinas, moléculas que forman los anticuerpos, las más relevantes en las técnicas de inmunohistoquímica son las IgG. La inmunoglobulina IgG es una molécula en forma de Y, formada por cuatro cadenas de polipéptidos; dos cadenas ligeras idénticas (~25KDa) y dos cadenas pesadas (~50KDa) conectadas por puentes de disulfuros



En el extremo de la zona bifurcada está la región Fab (Fragment antigen binding) responsable de la unión al antígeno. La región Fab está compuesta por una cadena ligera y el segmento del N-terminal de la cadena pesada.



Uso y tipos de anticuerpos

- La habilidad del sistema inmunológico animal para producir anticuerpos capaces de unirse específicamente a los antígenos, permite fabricar marcadores para detectar moléculas de interés.
- En general, existen tres tipos de anticuerpos que suelen utilizarse para aplicaciones de las técnicas de Biología Celular:
 - a) Anticuerpos policlonales
 - b) Anticuerpos monoclonales
 - c) Anticuerpos recombinantes

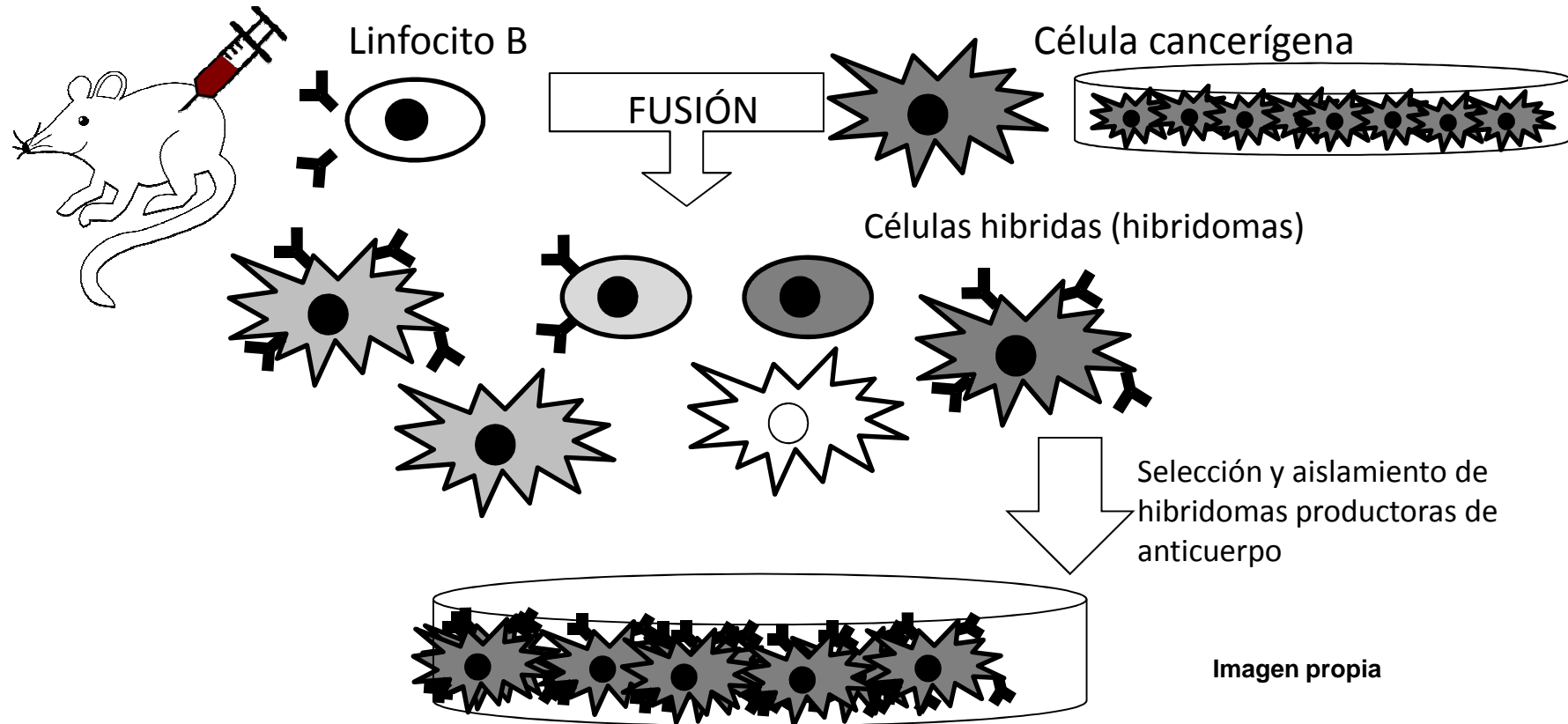


Tipos de anticuerpos

- Los anticuerpos **policlonales** requieren la inmunización de animales mediante la inyección de un antígeno determinado. Cuando una sustancia extraña (el antígeno) se inyecta en el cuerpo del animal, cada célula (linfocito B) produce un solo tipo de anticuerpo, pero diferentes linfocitos B producen anticuerpos estructuralmente diferentes que se unen a distintas partes del antígeno. Esta mezcla fisiológica natural de anticuerpos es conocida como 'anticuerpos policlonales'. Para su uso, resulta esencial una adecuada purificación del anticuerpo a partir de los fluidos de los animales. El grado de especificidad del anticuerpo conseguido, suele ser variable.
- Los anticuerpos **monoclonales** son anticuerpos idénticos producidos por una sola célula madre del sistema inmune. Para las aplicaciones celulares, los anticuerpos monoclonales se suelen producir a partir de líneas celulares de hibridomas obtenidas por fusión entre una célula que secreta el anticuerpo específico y una línea inmortal de mieloma. Los resultados obtenidos mediante anticuerpos monoclonales suelen ser más reproducibles que los de policlonales por lo que suelen ser los de elección.



Obtención de anticuerpos monoclonales



Para la obtención de anticuerpos monoclonales, se estimula a un animal mediante la inyección con el antígeno de interés. Posteriormente, se obtienen células inmunes del bazo y se fusionan con células de plasmocitoma, células plasmáticas transformadas, formando una célula híbrida, capaz de sintetizar anticuerpos y crecer indefinidamente.



Comparativa entre anticuerpos policlonales y monoclonales

ANTICUERPOS POLICLONALES	ANTICUERPOS MONOCLONALES
Mayor espectro de especificidad	Especificidad muy concreta
Producción más sencilla y barata	Producción más costosa y laboriosa
Mayor probabilidad de reacciones inespecíficas	Alta especificidad
Purificación laboriosa	La purificación no es siempre necesaria
Reactivo limitado/variable	Fuente ilimitada de anticuerpos



Anticuerpos recombinantes

- Además de los anticuerpos policlonales y monoclonales, en las últimas décadas se ha desarrollado una alternativa para producir anticuerpos sin necesidad de utilizar animales.
- Se trata de los denominados anticuerpos recombinantes, que se obtienen utilizando técnicas de ingeniería genética a partir de cultivos de bacterias o de levaduras.
- Para ello, se clonan segmentos de los genes que codifican las inmunoglobulinas para crear librerías de anticuerpos que mantienen su capacidad de unión al antígeno.
- Debido al menor tamaño que suelen tener estas moléculas de anticuerpos sintetizadas *in vitro*, suelen portar algunas mejoras, como su mayor accesibilidad a tejidos.

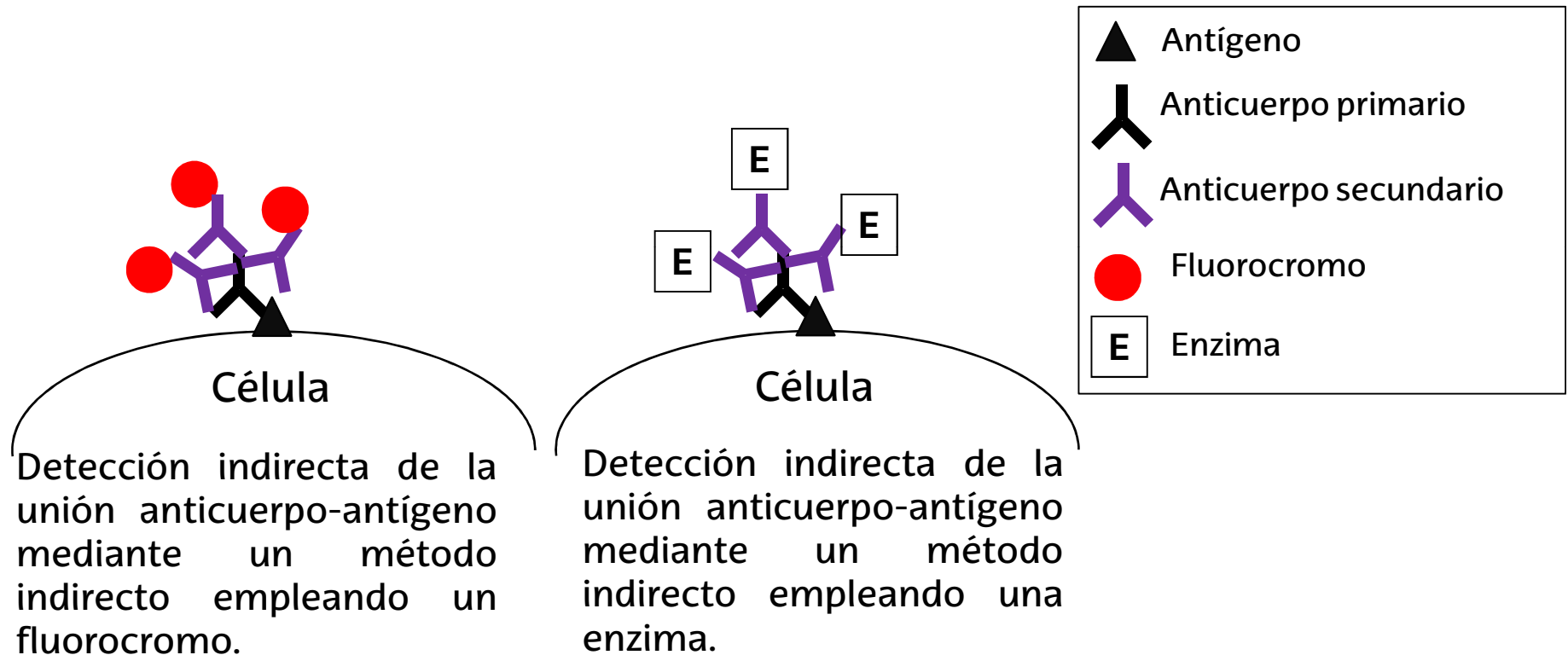


Método de detección indirecto

- Para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo, se necesita algún sistema de detección que produzca una señal o tinción detectable cuando esa interacción ha sucedido.
- El método más habitual consiste en utilizar un anticuerpo secundario que porta una molécula "reporter" pre-ligada, por ejemplo, un enzima o un fluorocromo, tras la reacción antígeno-anticuerpo específica inicial.
- Este anticuerpo secundario normalmente es dirigido contra moléculas de inmunoglobulinas IgG procedentes de una especie diferente de animal. Por ejemplo, si el anticuerpo primario se ha producido en conejo, se utiliza un anticuerpo secundario de otra especie animal que reconozca específicamente la IgG de conejo.
- A este tipo de detección se le suele denominar **detección indirecta**



Método de detección indirecto

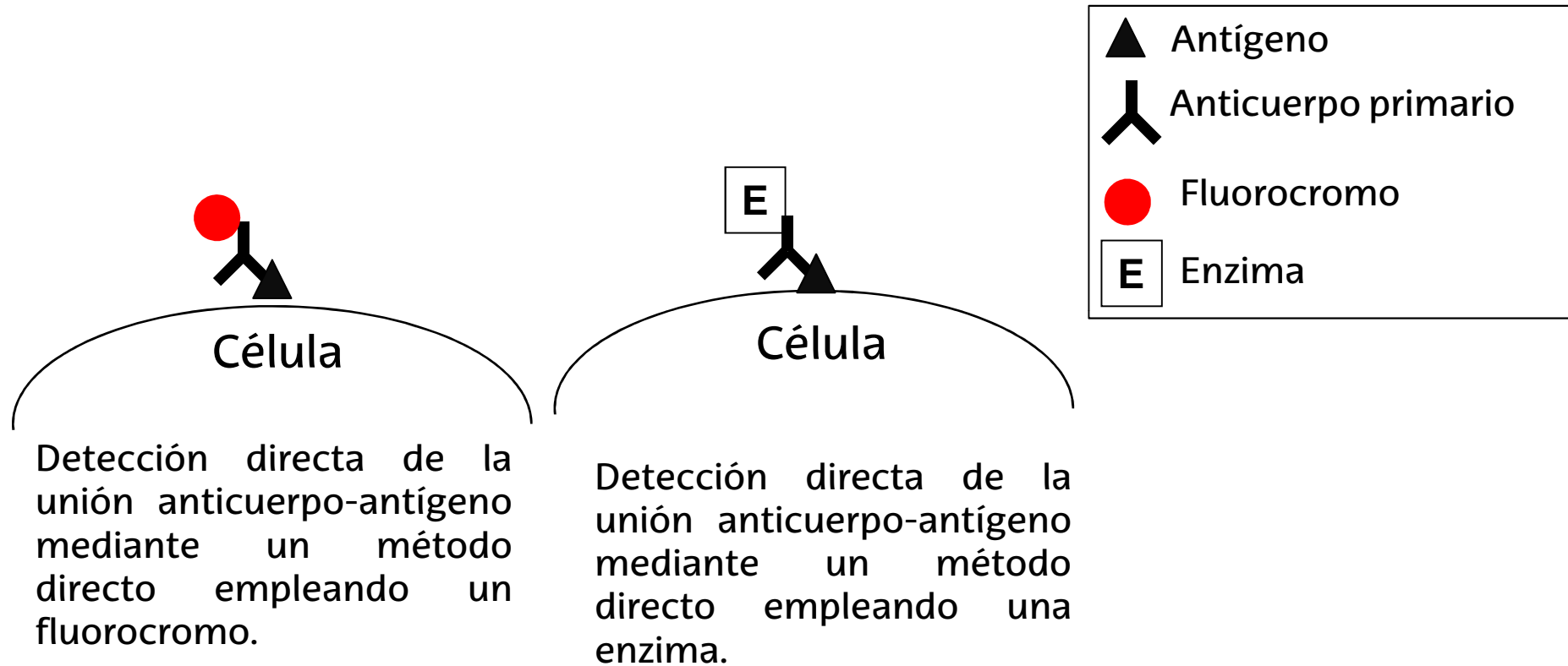


Método de detección directo

- El método de detección directo ocurre en un solo paso ya que el anticuerpo que reconoce el antígeno de interés, está marcado con, por ejemplo, un fluorocromo.
- Mientras que esta técnica utiliza un solo anticuerpo y por lo tanto es más simple y rápida que el método indirecto, la sensibilidad es más baja debido a la poca amplificación de la señal, en contraste con los enfoques indirectos.



Método directo de detección directo



DetECCIÓN DIRECTA VS. INDIRECTA

- Normalmente los métodos directos presentan algunos problemas como la necesidad de marcar todos los anticuerpos primarios que, además de ser un proceso largo y costoso, puede conllevar la alteración de la reactividad de los anticuerpos.
- Por otro lado, en los métodos indirectos, se evita la manipulación del anticuerpo primario, y los anticuerpos secundarios, al ser específicos frente a una especie determinada, pueden emplearse con diferentes anticuerpos primarios (siempre que se hayan logrado en la misma especie).
- Además, en los métodos indirectos se consigue una **amplificación de la señal** ya que varios anticuerpos secundarios se unen a un anticuerpo primario.



3. Cuantificación de melanina

- La melanina es un pigmento producido por los melanocitos que se acumula en los melanosomas antes de ser exocitado.
- Por ello, para determinar la cantidad de melanina, las células deben de ser lisadas para obtener el contenido intracelular.
- Un método habitual para lisar células es incubarlas con NaOH 1N a 60°C durante 1 hora.
- La melanina absorbe a 405nm, por lo que un análisis de la absorbancia de un lisado celular, en relación al número de células de partida, permitirá estimar la cantidad de melanina producida por las células de interés



Bibliografía

- Cell Culture Basics from Gibco [Internet]. Thermo Fisher Scientific [21 dic de 2011; citado el 25 oct. De 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=kbhQ29vRqs4>
- Passaging Cells: Gibco Cell Culture Basics Gibco [Internet]. Thermo Fisher [21 dic de 2011; citado el 25 oct. De 2016]. Disponible desde: https://www.youtube.com/watch?v=z_aK6pH3_G8
- *Unchern S. BASIC TECHNIQUES IN ANIMAL CELL CULTURE. In Laboratory Practice on Caco-2 Cell Culture. Drug Delivery System Workshop August 19-20, 1999 : Bangkok, Thailand. Disponible en: <https://www.hitpages.com/doc/5195013260574720/1#pageTop>*



INFORMACIÓN ADICIONAL PARA CONSULTA

- Bancroft J., Gamble M. 2002. Theory and practice of histological techniques. Ed. Churchill Livingstone. London. 796pp.
- Buchwalow IB., Böcker W. 2010. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Ed. Springer. Heidelberg. 153pp.
- Burry, Richard W. Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. 2010. Ed. Springer
- Fresney R.I. 2005. Culture of animal cells. 5th ed. Wiley
- Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K and Palanisamy M. **Applications of immunohistochemistry.** *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug; 4(Suppl 2): S307–S309
- Montuenga L., Esteban FJ., Calvo, A. 2009. Técnicas en histología y biología celular. Ed. Elsevier Masson. Barcelona. 392pp.

