

TRABAJOS PRÁCTICOS DIRIGIDOS

Profesorado:

Dr. Diego Romero García

Dra. Emma Martínez López

Dr. Antonio Juan García Fernández

Ldo. Alejandro Hernández García

**(Grupo de Investigación E008-12 Toxicología,
Universidad de Murcia, España)**

Sesión 3. Cultivos en suspensión (I). Preparación de cultivo de eritrocitos para estudio de citotoxicidad por espectrofotometría

El objetivo de esta práctica es la obtención de eritrocitos para realizar un estudio de citotoxicidad. La sangre se obtendrá de un animal sano procedente de animalario. En primer lugar se separarán los eritrocitos. Posteriormente se comprobará el estado del cultivo (número total de células por ml, porcentaje de células vivas, aspecto morfológico). Finalmente se prepararán los diferentes cultivos para un estudio de citotoxicidad mediante espectrofotometría (hemólisis).

Material adicional: videos.

Obtención de la sangre

Se utilizará un animal de la especie *Gallus gallus* (gallina), *Coturnix coturnix* (codorniz) o *Anas platyrhynchos* (ánade real). Se procederá de la siguiente manera:

- Se utilizará una jeringa de 5 ml y una aguja de color azul que contenga 0.5 ml de ácido cítrico:citrato sódico (anticoagulante).
- Se extraerá sangre de la vena radial preferentemente; si no es posible se hará de la yugular. Cantidad: 4.5 ml.

Obtención de eritrocitos (Laboratorio de Cultivo de Tejidos)

Reactivos y material necesario:

- Percoll 57%
- PBS glucosado (10 mM).
- Tubos de centrifuga de 15 ml.
- Filtros de 0.2 μ m.
- Jeringa de 10 ml para filtrar el PBS glucosado.

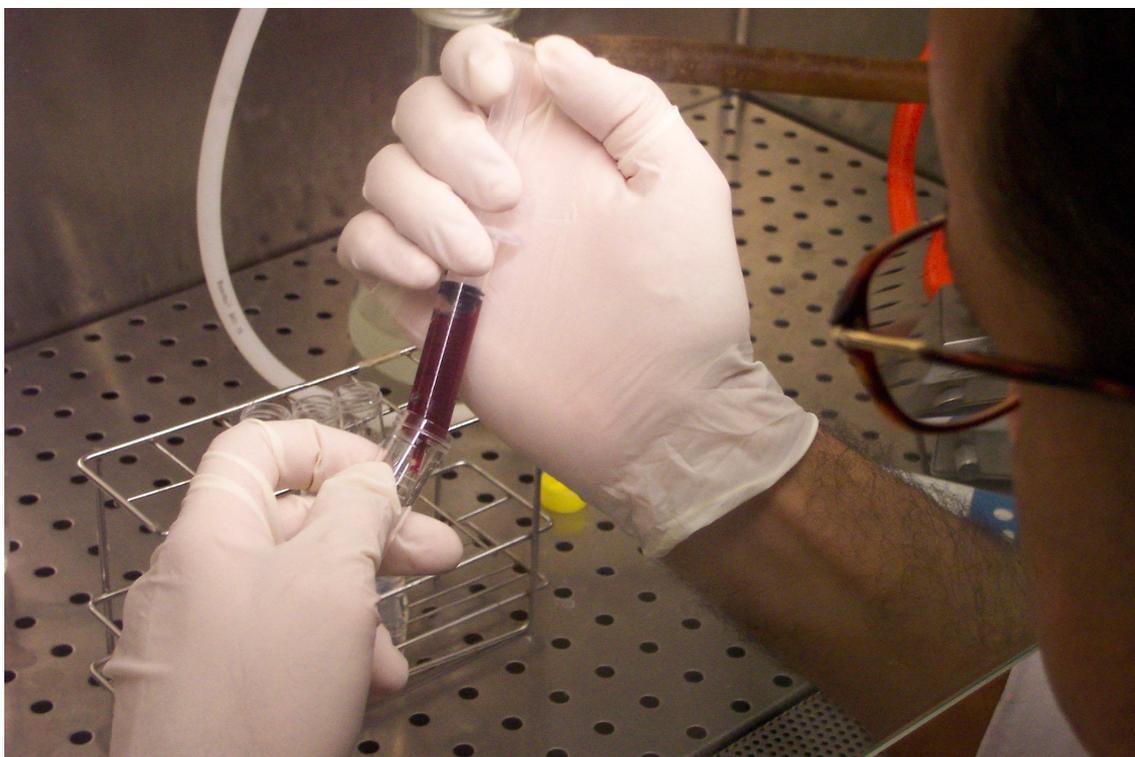
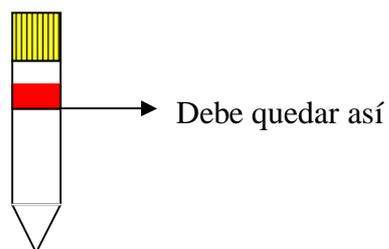
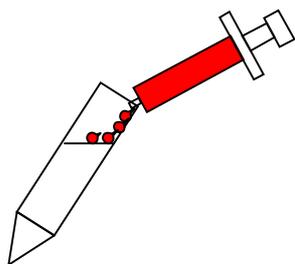
Preparación de Percoll 57%

- 57 ml de Percoll.
- 10 ml de medio de cultivo Hamk 10x.
- 33 ml de agua purificada estéril.

Una vez elaborado se conservará en refrigeración. Dejar a temperatura ambiente sólo el tiempo necesario.

Separación de las células:

- Usar 3 tubos de centrifuga de 15 ml.
- Añadir a cada tubo 10 ml de Percoll 57%
- Dejar caer con suavidad 1.50 ml de la mezcla sangre/citrato-ácido cítrico en cada tubo, en la superficie del Percoll.

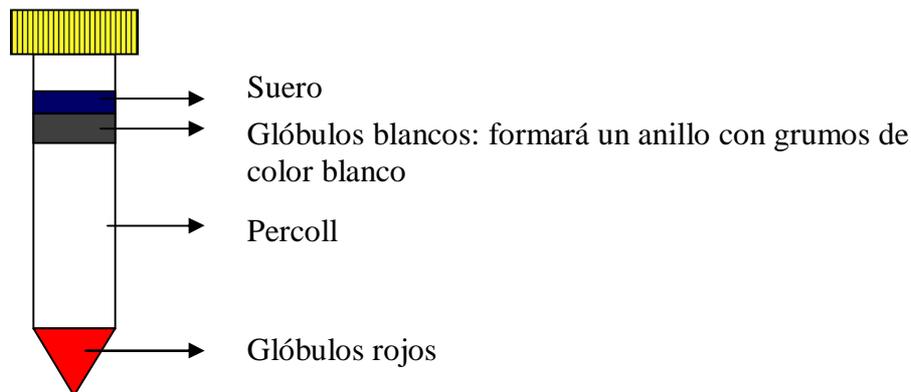


A continuación, Y SIN HACER MOVIMIENTO BRUSCOS, centrifugaremos:

- 1.600 rpm
- 30 minutos
- + 4°C

OJO: COMPROBAR QUE LA CENTRÍFUGA NO TIENE ACTIVADO EL FRENO. Esto es muy importante, pues si se queda el freno activado no se realizará la separación y perderemos la muestra.

Una vez terminada la centrifugación obtendremos las siguientes fases:



El suero (de color ocre suave) se desecha. La banda de glóbulos blancos (aspecto blanco y lechoso) se recoge con una pipeta Pasteur y se desecha. La banda Percoll se desecha. LA RECOGIDA DE GLÓBULOS ROJOS HA DE REALIZARSE CON SUMO CUIDADO, PUES SI NO CORREREMOS EL RIESGO DE HEMÓLISIS. Para hacerlo bien resuspenderemos cada banda de glóbulos rojos en 2-3 ml de PBS-glucosado. Posteriormente se recogen y se mezclan en un tubo de 15 ml (en este tubo irán las bandas de glóbulos rojos de los cuatro tubos), y se rellena hasta 15 ml con PBS glucosado.

Centrifugar este tubo a 1.600 rpm, 10 minutos, +4°C. Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado.

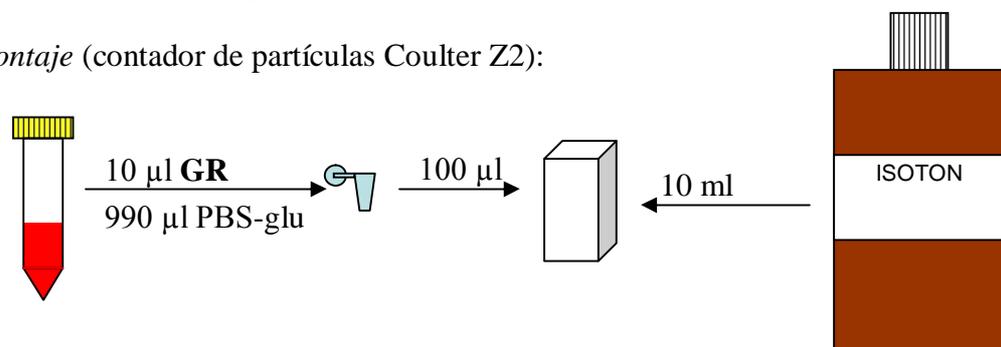
Resuspender el *pellet* de glóbulos rojos con PBS glucosado (4 ml).

Esto supone que, para una sangre que contenga 3×10^9 eritrocitos/ml, cada vez que tomemos 100 μ l de dicha sangre obtendremos 3×10^8 eritrocitos.

Contaje y viabilidad celular

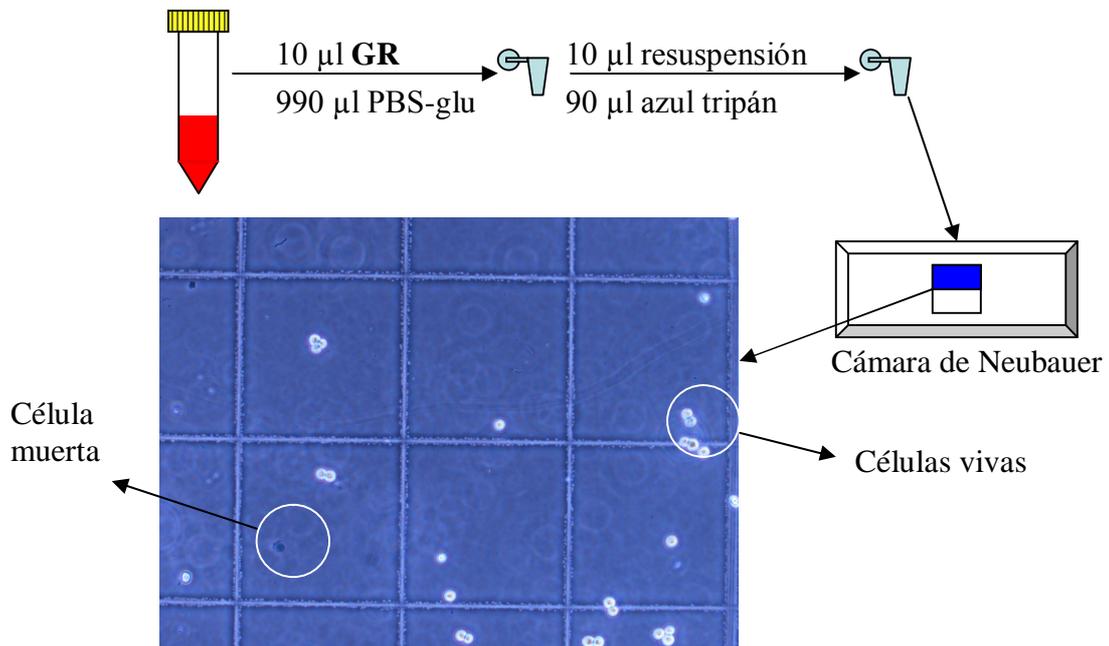
Una vez resuspendido y con la muestra bien homogeneizada procederemos al contaje de células y a la comprobación de la viabilidad por azul tripán, por citometría de flujo y por hemólisis. Para ello procederemos de la siguiente forma:

a) *Contaje* (contador de partículas Coulter Z2):



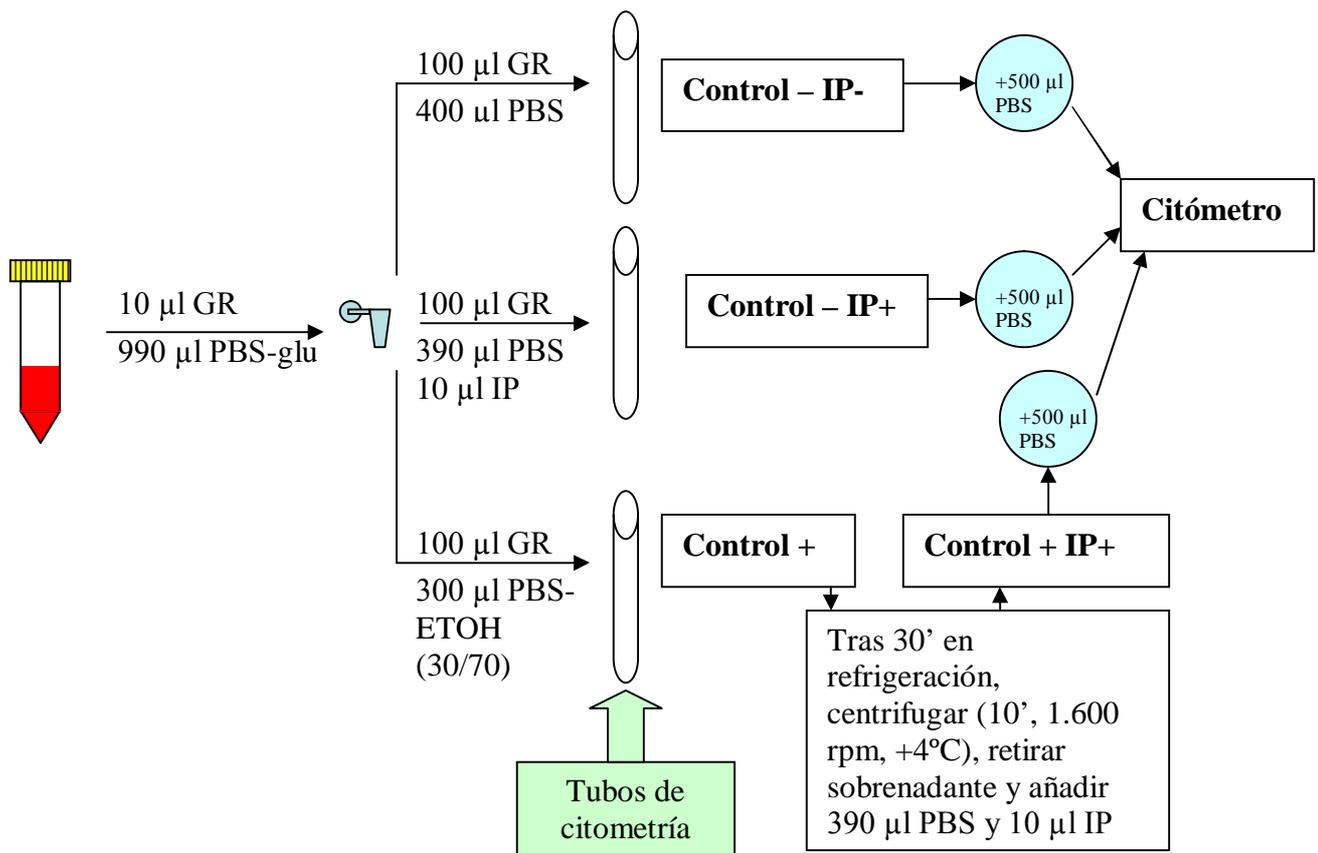
Para calcular el número de células/ml en el tubo de ensayo, hay que multiplicar por 100 el valor dado por el contador de partículas.

b) Viabilidad por azul tripán:



Contar en los cuatro cuadrantes y calcular porcentaje de eritrocitos vivos y muertos.

c) Viabilidad por citometría de flujo. Se seguirá la siguiente secuencia a partir de la resuspensión celular:



NOTAS:

IP: yoduro de propidio (400 µg/ml, C₂₇H₃₄N₄I₂), dejándolo en oscuridad y temperatura ambiente durante 10-15 minutos. IP- : muestra sin yoduro de propicio; IP+: muestra con yoduro de propicio.

Por control – (control negativo) entendemos a aquel control en el que las células han de estar, *a priori*, vivas en un porcentaje próximo al 100%.

Por control + (control positivo) entendemos a aquel control en el que las células han de estar todas muertas, en un porcentaje próximo al 100%. Para ello se puede usar una combinación PBS-etanol (PBS-ETOH).

La evaluación de la viabilidad celular mediante esta técnica se realizará a una longitud de onda de 488 nm.

El orden de paso de las muestras por el citómetro de flujo será el siguiente:

- 1) Control negativo, IP negativo: para localización de las células en el histograma de dispersión e histograma de fluorescencia.
- 2) Control positivo, IP+: para ajuste de posición del histograma de fluorescencia.
- 3) Control negativo, IP+: control de viabilidad celular

d) *Estudio de viabilidad por hemólisis.*

Estos ensayos se realizarán en el laboratorio de Toxicología. Para ello hemos adaptado el protocolo nº 37 de INVITOX “Red blood cell test system” para examen rápido del potencial de irritación de tensioactivos.

El protocolo a seguir es el siguiente:

En primer lugar, y con la sangre recién recolectada haremos una prueba de hemólisis para comprobar el estado inicial de las células. Partimos de eritrocitos separados y resuspendidos en los 4 ml de PBS-glucosado. Tomaremos 100 µl (según los cálculos anteriores 3 x 10⁸ células) y lo resuspendemos en:

- 1.000 µl de PBS-glucosado: control negativo (no deberá de haber hemólisis)
- 1.000 µl de agua purificada: control positivo (máximo de hemólisis)

NOTA: el máximo de absorbancia ha de estar cercano a 2.0. Si hay demasiadas células se nos saldrá el valor del rango detectable por el espectrofotómetro. Por otro lado si hay pocas células no podremos comparar los resultados cuando hagamos exposiciones a agentes químicos (metales).

Tras 10 minutos de exposición en el agitador rotativo (velocidad mínima, 39°C), centrifugamos en una microcentrífuga (10.000 rpm, 1 minuto).

Lectura en espectrofotómetro:

- Seleccionar modo fotométrico.
- Lectura: 542 nm.
- Medir absorbancia del agua destilada.
- Hacer autocero.
- Medir absorbancia del sobrenadante del control negativo.
- Hacer autocero.
- Medir absorbancia del control positivo.

NOTA: la absorbancia del control negativo frente al agua ha de ser como mucho de 0.100. Si sobrepasa este valor desecharemos la muestra por haber hemólisis espontánea.

Una vez comprobado que la suspensión de eritrocitos presenta una viabilidad adecuada (superior al 95% en cada técnica), se procederá a preparar el material para el ensayo de citotoxicidad con evaluación por espectrofotometría.

Preparación de cultivo de eritrocitos para estudio por espectrofotometría

Una vez separadas las células y conocidas sus características (nº total de células y viabilidad) procederemos al desarrollo experimental realizando las exposiciones a un agente químico (plomo) para el estudio de citotoxicidad en función de la hemólisis.

Para ello utilizaremos las concentraciones siguientes en microtubos:



Plomo: 0.1-0.3-0.5-0.7-
0.9-1.0-1.25-1.5-2-3 mM



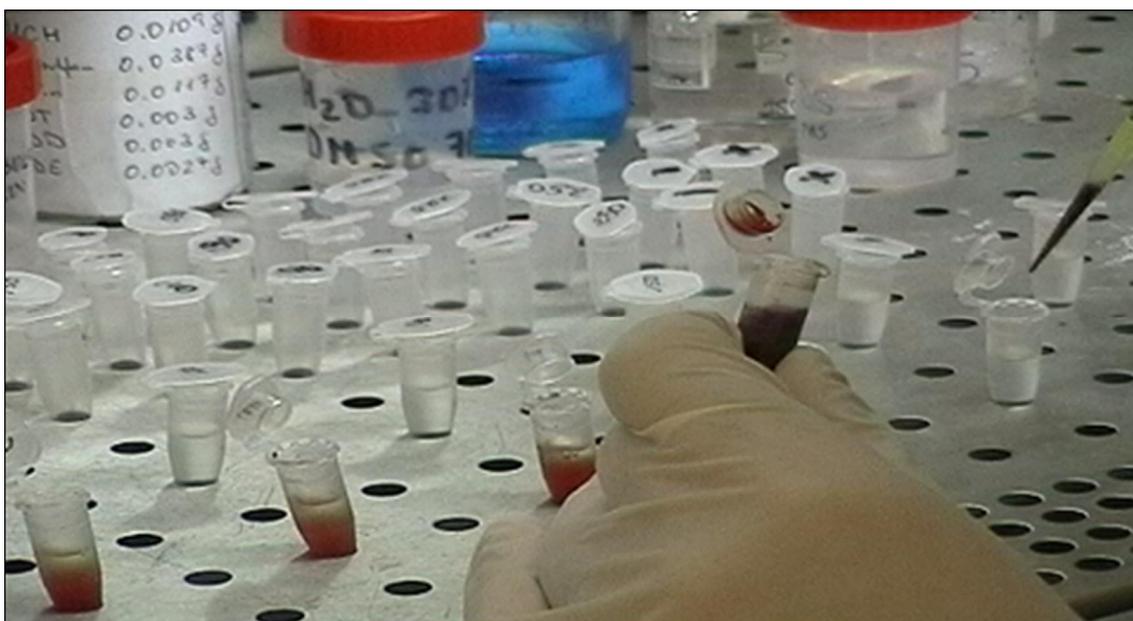
Control negativo



Control positivo

Resuspenderemos 100 µl de suspensión celular en:

- 1.000 µl de PBS-glucosado: control negativo
- 1.000 µl de agua purificada: control positivo
- 1.000 µl de PBS-glucosado con la concentración del metal



Los microtubos serán colocados en un agitador rotativo y así se dejarán durante 24 horas a 39°C.

