

Desarrollo y optimización de un método para evaluar la proliferación celular

Laura S. Licciardi*, Carola Solari**, Daniela Vittori#, Nicolás Pregi#, Alcira Nesse#

*E.N.S.N°2 "Mariano Acosta"; **Escuela Argentina Modelo; #Área Análisis Biológicos, Dto. Química Biológica, FCEN, UBA

INTRODUCCIÓN

El número de células puede ser determinado por recuento en cámara de Neubauer (CN) en el microscopio. Los valores obtenidos no siempre son exactos ya que existen múltiples factores de error, que van desde la subjetividad del observador hasta el tiempo que requiere analizar varias muestras.

Utilizando como modelo experimental una línea celular, se desarrolló un método para evaluar proliferación celular, con el fin de minimizar los problemas planteados, permitiendo evaluar con precisión y de forma objetiva, numerosas muestras simultáneamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células. Línea leucémica UT-7, dependiente de eritropoyetina (EPO) para proliferar. Las células se cultivaron en diferentes condiciones (con o sin 1 U/ml de EPO), en medio de cultivo IMDM, suero fetal bovino, y antibióticos, a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad, por un período mínimo de 48 h.

Ensayo clásico. El recuento celular se realiza en la CN (Fig. 1) que permite establecer la concentración de células. La suspensión celular, después de centrifugación, fue diluida 1:2 en solución del colorante azul Tripán para determinar viabilidad. El número de células por ml se determinó mediante la fórmula: células/ml = N/4.10⁶. dilución

Ensayo de proliferación. Este ensayo tiene como objetivo la determinación del efecto causado por algunas

drogas u hormonas en el desarrollo natural de determinadas células, produciendo aumento o disminución de la proliferación.

Ensayo colorimétrico. El MTT es una sal soluble de color amarillo que se transforma en un formazán azul insoluble (cristales) por las células vivas. La cantidad de formazán que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Brevemente, el procedimiento utilizado consiste en agregar 10 µl de MTT (5 mg/ml) a células (tratadas o no) suspendidas en 100 µl de medio, 4 h de incubación a 37°C, centrifugación y adición de 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 25 µl de solución buffer para lisis de las células.

Para determinar la absorbancia de luz por parte de la muestra a una longitud de onda de 540 nm, se utilizó un

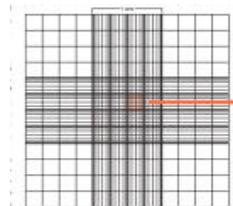


Figura 1. Esquema de una CN. En los 4 cuadrantes, de los extremos, conformados por 16 campos, se realizó el recuento de las células UT-7.

RESULTADOS

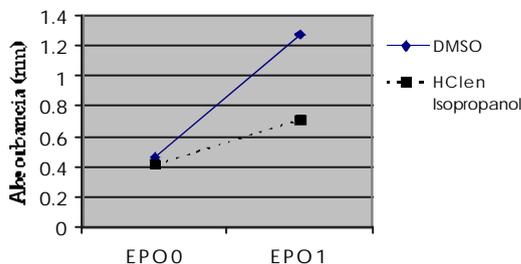


Figura 2. Selección del disolvente de los cristales de formazán. El protocolo original contemplaba el uso de una mezcla de HCl/Isopropanol para disolver los cristales, pero se observaba una suspensión turbida después de la incubación. Para la resolución de este problema se realizaron ensayos con distintos disolventes. Se emplearon: HCl/Isopropanol (muestra 1), un detergente llamado SDS (muestra 2) o DMSO (muestra 3). Se observó que las muestras 1 y 2 se volvieron turbias siendo la muestra 2 de imposible análisis en el lector de ELISA. Sólo se prosiguió con las muestras 1 y 3.

En ausencia de EPO, donde el número de células es muy bajo, ambos disolventes parecen actuar en formas similares. Cuando las células son estimuladas con EPO y la proliferación es importante se observa una mejor disolución de los cristales con el uso de DMSO.

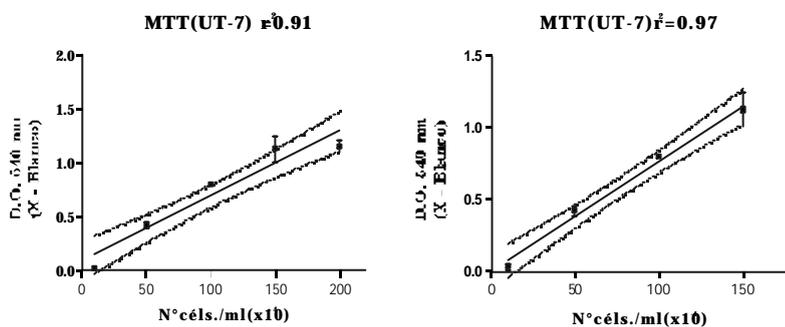


Figura 3. Estudio del efecto que tiene el MTT con respecto a la variación del número de células. Se ensayaron 5 concentraciones de células (a). Cuando se elimina el valor correspondiente al número más alto de células (b), se observa mejor linealidad (coeficiente de correlación más alto). Esto indica que el rango de trabajo óptimo para este método es 1x10⁵

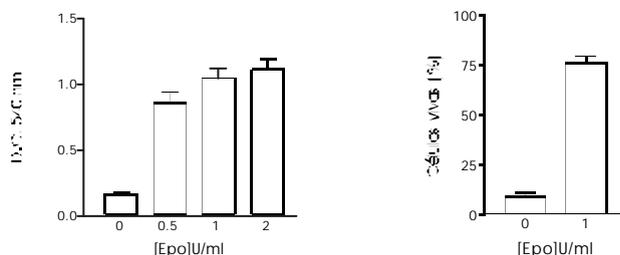


Figura 4. Aplicación del método de MTT a la determinación de proliferación de células UT-7 estimuladas con Epo. Diferentes concentraciones de Epo producen un aumento proporcional de la proliferación celular que es demostrado por un incremento de la absorbancia en análisis con MTT (a). Para comparar, se muestra la relación entre la proliferación celular en ausencia y en presencia de Epo, determinada por recuento en CN con colorante azul Tripán

CONCLUSIONES

El uso de DMSO permitió la optimización del método

El color desarrollado es proporcional al número de células vivas en el rango 1x10⁵ - 1.5x10⁶ células/ml

El método resultó apropiado para estudiar la acción de la eritropoyetina sobre la proliferación de células UT-7