



Memoria de alumno interno de Inmunología: Gonzalo Lendínez Sánchez

Departamento: Inmunología

Año: 2014-2016

Tutor: D.Enrique García Olivares

Grado de satisfacción: notable (8)

En este documento describo un poco sobre mi experiencia como alumno interno de Inmunología durante más o menos 2 años, lo que vendría a ser cuando yo cursaba 2º y 3º de medicina. Obtuve la plaza tras la evaluación de un jurado de 3 profesores del departamento entre los que se encontraba mi tutor, Enrique García Olivares. Tras una entrevista personal, un examen oral de conocimientos en Inmunología y la nota del expediente, decidieron que era el candidato más adecuado para ser alumno interno de Inmunología. He de destacar varias cosas respecto a este departamento:

La primera es que el nombre completo del departamento es Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología; esto quiere decir que cuando este departamento saque una plaza de alumno interno hay que verificar qué parte requiere de un alumno interno, y si se puede, quién es el tutor encargado del alumno. Puede evitar confusiones.

Lo segundo es que tanto la experiencia, lo que puedas aprender, investigar e incluso el lugar de trabajo, depende de quién sea tu tutor. En mi caso fue el doctor García Olivares, director de dicho departamento y que trabaja en el Centro de Investigación Biomédica de Granada (CIBM) como investigador principal y jefe de un grupo de investigación centrado en el estudio de biología molecular e inmunología de las células endometriales así como la ausencia de rechazo del embrión por parte de la madre; siendo éste un cuerpo extraño y que debería ser atacado por el sistema inmune materno. El emplazamiento de mi lugar de trabajo en el PTS fue en un principio negativo, pues en mi primer año como alumno interno, la facultad de medicina se encontraba aún en su antiguo emplazamiento en Avenida de la Constitución, por lo que el tiempo que podía asistir al laboratorio, localizado en el Parque Tecnológico de la Salud (PTS) era bastante reducido. Cuando se produjo el traslado de la facultad al PTS, mi dedicación pudo ser mucho mayor y fue realmente el año donde más aprendí.

En tercer lugar he de decir que mi tutor considera que obtener el grado en medicina es prioritario y la actividad de alumno interno es secundaria, por lo que no hay obligaciones y participas tanto como puedas y quieras según tu disponibilidad y el trabajo que haya en el laboratorio. La idea inicial de mi actividad como alumno interno era formarme en las distintas prácticas y técnicas que se realizan en el laboratorio del CIBM, y posteriormente llevar a cabo



un pequeño proyecto práctico supervisado por él. Por falta de fondos en investigación esta última parte no ha sido posible todavía, sin embargo en una de las tutorías que tuve con el doctor Olivares sobre los aspectos teóricos de estas células madre endometriales con las que trabajan surgió la idea de escribir un artículo de revisión sobre las posibles aplicaciones de estas células. Este fue el resultado:

http://www.actualidadmedica.es/index.php?option=com_content&view=article&id=406:re01&catid=141:800&Itemid=779

Para finalizar, destacar que de mi formación dentro del laboratorio han sido responsables las alumnas del máster en inmunología. Os dejo aquí parte del cuaderno de laboratorio donde resumo todas las técnicas y tareas aprendidas como alumno interno del departamento; Mi tarea consistía casi todos los días en los apartados 1, 2, 5 y 7:

A continuación describo las técnicas de laboratorio y demás conocimientos adquiridos sobre cultivos celulares que las estudiantes de máster Marina y Rocío me han enseñado durante estos dos años como alumno interno del departamento de Inmunología de la Universidad de Granada.

Índice de contenidos.

- 1. Cambiar medio de cultivo**
- 2. Tripsinización/Pase celular**
- 3. Congelación y descongelación de líneas celulares**
- 4. Aislamiento de muestras biológicas**
- 5. Citometría de flujo**
- 6. Estandarizar el número de células en cultivo**
- 7. Evaluación de la apoptosis**
- 8. Ensayo de proliferación celular con CFSE**
- 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**
- 10. Electroforesis en gel de agarosa**
- 11. Lavado peritoneal de ratones**

Cambiar medio de cultivo

Comienzo describiendo el procedimiento más básico e importante. Se trata del cambio de medio de cultivo pues las células se nutren a partir de elementos básicos como azúcares y aminoácidos presentes en el medio de cultivo. Si estos nutrientes se agotan las células acabarían muriendo por desnutrición y por el acúmulo de sustancias de desecho. Tipos de medio de cultivo hay varios, elegiremos uno u otro en función del tipo celular:



- DMEM: Para células EnSC y DSC que son con las que más he trabajado. Utilizamos este medio para estas células porque son más exigentes nutricionalmente.
- RPMI: Para células tumorales por ser células que viven en condiciones nutricionales más pobres.

Además los medios de cultivo son enriquecidos con ciertas sustancias

- Suero Bovino Fetal (3%) Supone un aporte nutricional extra
- Antifúngico/Anfotericina B (1%)
- Antibiótico/Amoxicilina (1%)

El procedimiento es muy sencillo:

1. Eliminar del flask o frasco de cultivo el medio anterior con los productos de desecho con una pipeta o vertiendo directamente el contenido en un recipiente con lejía.
2. Lavar el flask con 8ml de PBS
3. Administrar el nuevo medio de cultivo, 8ml para flask pequeños o 10 ml para flask grandes.

Tripsinización/Pase Celular.

Las células endometriales y decidualizadas presentan adherencia al plástico de forma natural, por ello cuando han proliferado tanto (el cultivo está confluyente) es necesario realizar un cambio a un flask más grande o dividir las células en dos flasks para que éstas puedan seguir creciendo sin interrupciones espaciales. Este proceso completo recibe el nombre de pase.

1. Como en el procedimiento anterior eliminamos el medio de cultivo existente con una pipeta o bien vertiéndolo directamente al recipiente de desechos líquidos.
2. Lavamos con 8ml de PBS
3. Posteriormente eliminamos las uniones entre las células y el plástico para lo cual nos serviremos de la enzima tripsina. Añadimos 1 o 2 ml de tripsina al flask sobre la superficie menor donde se apoyan las células
4. Dejamos actuar a la tripsina durante unos 2-3 minutos. No debemos prolongar excesivamente el tiempo de actuación de la tripsina pues puede ser tóxica para las células
5. Inactivamos la tripsina. Para ello podemos añadir 1 o 2 ml de SBF o 8-10 ml de medio de cultivo si la línea celular es más resistente (línea tumoral)
6. Añadimos 6 o 7 ml de PBS para trabajar con mayor cantidad de volumen pues debemos pasar el contenido del flask a un frasco universal.
7. Centrifugamos el contenido del frasco universal en el programa de tripsinización: 1500rpm; 22°C; 5min.
8. Desechamos el contenido líquido resultante de la centrifugación quedándonos únicamente con un pellet blanco en el fondo.
9. Resuspendemos el pellet en PBS y añadimos las células en los nuevos flask y completamos el flask con medio de cultivo hasta 10ml.



Congelación y descongelación de líneas celulares.

La congelación de las células permite que éstas queden invariables a lo largo del tiempo. Para ello se introducen las células en un medio de cultivo especial para su criopreservación. La velocidad de congelación ideal para que las células no sufran variaciones importantes debe ser de 1°C/minuto. Para ello las introducimos cuidadosamente en uno de los congeladores del centro de investigación biomédica que mantiene una temperatura de -80°C.

Mediante este proceso las células pueden permanecer durante décadas hasta que decidamos recuperarlas. Para ello será necesario un protocolo de descongelación.

Me enseñaron dos procedimientos:

1.- El primero es el **método estándar**: Pasar las células del vial de congelación a un frasco universal y añadir algo de PBS para que los volúmenes a manejar sean más grandes y podamos equilibrar bien el universal en la centrifugadora. Centrifugar al programa de tripsinización. Cuando finalice la centrifugadora, verter el líquido y resuspender el pellet con 1 ml de medio e introducir las células en el flask. Completar el flask con 8 ml de medio de cultivo.

2.- El segundo es un **método más rápido y sencillo**. Sacar del congelador (-80°C) el vial y calentar durante unos minutos con la mano hasta que no quede resto sólido. Rellenar el flask con 5 o 7 ml de medio, coger otros 3 ml de medio con la pipeta y resuspender en la misma pipeta con el contenido del vial. Añadir todos los restos celulares del vial al flask pequeño. Este método más rápido y sencillo tiene el inconveniente de que el medio de cultivo de congelación es tóxico, por lo que se debe cambiar el medio de cultivo en las próximas 24 horas.

Aislamiento de muestras biológicas.

Se trata del primer procedimiento a realizar cuando recibimos la muestra. En nuestro caso se trata de sangre menstrual y debemos de obtener únicamente las células madre endometriales.

1. Añadir PBS a la muestra hasta completar un volumen total de 10ml.
2. Resuspender con una pipeta Pasteur y añadir 4ml de Histopaque. El histopaque es un compuesto que nos permite separar la sangre en sus componentes dejando: Plasma, capa leucocítica, Ficoll-paque (donde se encuentran las EnSC), eritrocitos y granulocitos.
3. Añadir muestra+PBS+Histopaque a un frasco universal para centrifugar con el siguiente programa: 20min – 22°C – 2200rpm – Desaceleración libre
4. Al terminar el programa y con precisión se debe extraer con una pipeta Pasteur la delgada película donde se encuentran las EnSC
5. Introducir estas EnSC a un frasco universal y realizar una segunda centrifugación con el programa de tripsinización.
6. Eliminar el sobrenadante de la centrifugación y nos quedamos con el pellet
7. Resuspender el pellet con 2 ml de PBS y añadir 1 ml a cada flask donde cultivaremos las EnSC

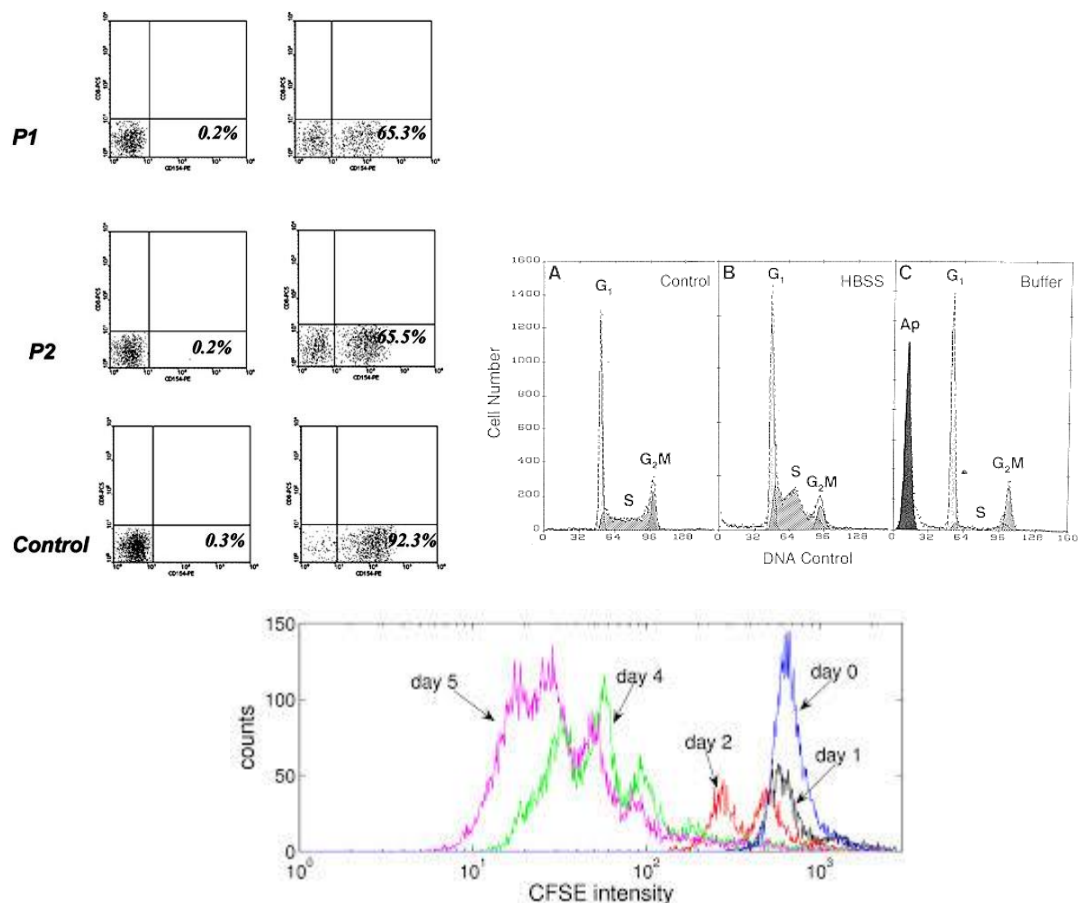


Citometría de flujo

Se trata de la herramienta más utilizada en el laboratorio de inmunología. Utiliza una tecnología basada en haces de luz, láseres y fotosensores para el recuento y clasificación de células, según sus características fenotípicas o por la presencia de marcadores (fluorescentes o isotópicos)

En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células.

Los resultados son mostrados en el ordenador y suelen ser de la siguiente forma:



Estandarizar el número de células en cultivo.



Este procedimiento se realiza para tener la misma cantidad de células en cada pocillo a estudiar y así poder realizar posteriormente otros estudios de viabilidad celular, evaluación de la apoptosis o proliferación.

1. Tripsinizar las células del flask y quedarnos con ellas en un frasco universal
2. Extraer una muestra de 10 microlitros en un endorf
3. Añadir al endorf 10 microlitros de azul tripano, colorante que nos distinguirá células muertas. La dilución resultante es de X2 pues hay el doble de cantidad de líquido que de células
4. Contar las células en la cámara de Neubauer en el microscopio invertido. La cámara de Neubauer tiene 4 cuadros grandes en cada esquina, cada uno de los cuales contiene 16 cuadros pequeños (4x4). Con el objetivo de 10 aumentos podemos ver un cuadro grande de golpe y contamos el número de células en los 4 cuadrantes.
5. La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer es:
Concentración = número de células x 10.000/(número de cuadros x dilución)

Ejemplo: Contamos en total 62 células. Concentración: $620000/(4 \times 0,5) = 310000$ cel/ml

6. Una vez obtenida la concentración de células que cultivamos en el flask, debemos de pasar una cantidad determinada a los pocillos, en función de las necesidades del experimento. Para ello utilizamos una proporción:

Ejemplo: Queremos 300000 células por pocillo. $310000/1\text{ml} = 300000/"x"\text{ml}$ "x" = 0.968ml

Evaluación de la apoptosis.

Este procedimiento permite calcular la cantidad de células que mueren en un periodo de tiempo. Utilizamos una solución de yoduro de propidio con ARNasa. Este compuesto tiene la capacidad de adherirse a los ácidos nucleicos y sabiendo que las células apoptóticas tienen el ADN fragmentado, analizamos por citometría de flujo el tamaño de los fragmentos de ADN a los que se une el yoduro de propidio y podemos saber qué células estaban muertas, en G1 o G2. Los fragmentos más pequeños corresponden a células apoptóticas y los fragmentos más grandes a células vivas.

La ARNasa se a la disolución porque el yoduro de propidio se adhiere y tiñe ácidos nucleicos sin distinguir entre ADN y ARN, pero a nosotros sólo nos interesa el ADN, por lo que debemos degradar el ARN completamente.

Este procedimiento nos permite estudiar la apoptosis de una población y compararla con otro tipo celular, concretamente Marina estudió la apoptosis entre EnSC y DSC en un medio de cultivo u en otro.

1. Tripsinizar las células que se encuentran en los pocillos con el momento al que está estimulado realizar el procedimiento (horas/días) y pasarlas a un frasco universal
2. Centrifugar 5 min – 4°C - 1500rpm



3. Resuspendemos el pellet en 100 microlitros de PBS por tubo de citometría a analizar y retirar el sobrenadante.
4. Fijar las células con etanol (70%) 900microlitros por tubo. Colocar el tubo de citometría en hielo para que actúe el etanol.
5. Dejamos reposar la muestra 5 min a 4°C y añadimos 4ml de PBS.
6. Centrifugamos 2 min a 3500rpm.
7. Retiramos el sobrenadante y secamos los bordes del tubo con papel
8. Añadimos 250 microlitros de PBS y 250 microlitros de buffer de extracción de ADN (37°C) y lo dejamos 10 min a 37°C en la estufa (en seco)
9. Pasado este tiempo centrifugamos 2min a 3500rpm
10. Retiramos el sobrenadante y secamos los bordes del tubo con papel.
11. Añadir la solución de yoduro de propidio (200 microlitros por tubo):
 - a. 190 microlitros de PBS no esteril
 - b. 8 microlitros de yoduro de propidio (1mg/ml)
 - c. 2 microlitros de RNAasa (10mg/ml)
12. Lo dejamos incubar con papel de aluminio 30 min a 37°C
13. Pasar las células por el citómetro de flujo.

Ensayo de proliferación celular con CFSE

Para estudiar la proliferación celular a lo largo del tiempo utilizamos una sustancia denominada CFSE. Esta sustancia básicamente es una sustancia fluorescente que se fija a las membranas celulares y que es detectada por el citómetro. Se añade en un momento t₀, cuando debe tener un momento máximo de fluorescencia, pues al ir dividiéndose, la fluorescencia se divide entre la descendencia, pues la cantidad de CFSE va disminuyendo conforme las células se dividen en los sucesivos momentos t₁, t₂ etc.... Eso significa que a menor fluorescencia, mayor proliferación y viceversa.

1. Tripsinizar las células y centrifugarlas en tubo universal a 1500rpm durante 5 min
2. Resuspender en 2,2 ml de PBS
3. Sacar 200 microlitros al tubo de citometría para pasar las células sin marcar (CFSE-)
4. A los 2ml restantes del universal añadir la **disolución de CFSE-DMSO**
CFSE, viene en polvo y son 5 microgramos
DMSO, es líquido y se añaden 17,94 microlitros al tubo donde están los 5 microgramos de CFSE
5. Incubar 10 min a 37°C
6. Añadir 15 ml de medio (OptiMEN)
7. Incubar 30 min a 37°C
8. Tras la incubación, completar el volumen total (deben ser 11 o 12ml) con PBS hasta llenar el universal por completo
9. Centrifugar 5 minutos a 1500rpm
10. Retirar sobrenadante y repetir el lavado 3 veces, completando cada vez el universal con PBS en cada lavado



11. Tras el último lavado, resuspender el pellet, pasar una muestra por el citómetro a tiempo 0 y el resto sembrar en placas de cultivo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR amplía un fragmento de gen (que nosotros hemos seleccionado mediante los primers) varias veces para que posteriormente al colocarlo en un gel de agarosa los distintos fragmentos de ADN (genes) vayan migrando en función del número de pares de bases nitrogenadas. En el gel de agarosa por tanto además de colocar las muestras de ADN a examinar colocaremos un “peso molecular” que contiene una gradación estándar de distintos fragmentos de ADN de distintos tamaños. Además añadiremos un CTRL +: para comprobar que sí amplifica ADN y un CTRL -: Para comprobar que no se han producido errores ni contaminaciones.

Los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR deben de ser añadidos en un orden específico en los eppendorf, que serán los recipientes que finalmente añadiremos al termociclador:

1. NFW (Nucleases free water): en cantidades variables, pues el volumen total final del eppendorf debe ser de 50microlitros. En nuestro caso fue de 18 microlitros
2. DMSO: 5 microlitros
3. Primers: 1 microlitro. El primer elegido fue el del gen humano citocromo P-450
4. PCR mix: 25 microlitros. Es lo último en añadirse pues contiene la polimerasa, las bases nitrogenadas, catalizadores
5. Muestra de ADN a analizar: Necesitamos un microgramo de ADN y la concentración es muy variable pero hay que tener en cuenta que en función de esta concentración tendremos que añadir más o menos NFW. EJEMPLO: ADN a concentración de 1microgramo/1microlitro tendremos que añadir 1 microlitro de disolución de ADN y 18 microlitros de NFW, pero de ser 0.5microgramos/1microlitro, necesitaremos 2 microlitros de ADN y 17 de NFW.
6. Una vez que la mezcla se ha completado se centrifuga unos segundos para que no quede ningún resto en las paredes del eppendorf y esté todo homogeneizado, pues hay riesgo de que la cantidad ínfima de polimerasa se quede en la pared y no se amplíen los genes aunque el resultado fuese positivo.
7. Al finalizar la PCR tras el tiempo necesario en el termociclador, las muestras se dejan en el congelador a -20°C, hasta que se decida a revelar el resultado en el gel de agarosa.

Electroforesis en gel de agarosa



Proceso posterior que tiene, entre otras funciones, revelar los resultados de la PCR.

Consiste en hacer migrar las muestras de ADN a través del gel y que estas se vayan separando por el tamaño (medido en pares de bases nitrogenadas).

El protocolo es el siguiente:

1. Colocar y nivelar el molde donde se añadirá el gel, para ello utilizamos una burbuja de aire.
2. En un matraz introducir 150ml de TAE (disolución para la agarosa)
3. Pesamos 1,5 gramos de agarosa para que esté al 1% de concentración
4. Lo mezclamos y calentamos al microondas aproximadamente 2 min
5. Vertemos la mitad aproximadamente en un vaso de orina y echamos 3 microlitos de bromuro de etidio. El bromuro de etidio es altamente cancerígeno por lo que trabajaremos en una campana de extracción de gases.
6. Agitamos el vaso de orina y lo vertemos sobre el molde. Añadir la mitad restante en el matraz directamente al molde.
7. Colocar el peine con un número de dientes en relación con el número de muestras + controles positivos y negativos + peso molecular.

P + - nºdemuestras + p

8. Dejar esperar 20-22 min para que solidifique el gel. En el caso de no tener preparadas las muestras a los 20 min recubrir el molde del gel ya sólido, con la solución de la electroforesis para que no se reseque
9. **TAMPÓN DE CARGA:** Se trata de una composición de **glicerol+ colorante (azul de bromofenol)**
El glicerol añade densidad para que la muestra caiga al fondo y el azul de bromofenol para poder visualizar la migración. Mediante la ecuación: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$ tendremos que averiguar que volumen inicial de tampón de carga debemos añadir. El volumen final de las muestras debe ser de 30 microlitros, la concentración inicial del tampón de carga es de 6X y la final debe de ser de 1X.
10. Los CTRLs tienen 12 microlitros como V_f . Realizar cálculos para CTRLs y muestras por separado.
11. Añadir el tampón de carga (5microlitros para muestras y 2 microlitros para controles)
12. Cargar el gel, introduciendo las muestras, CTRLs y peso molecular.
13. Conectar a 120V la cubeta de electroforesis previamente preparada y esperar 20-25 min para ver el resultado final.
14. Ecurrir el molde, colocarlo en el transiluminador, conectar las luces UV y ver las distintas barras de migración.

Se van a ver diferentes bandas de lo que hayamos amplificado en función de los pb que tenga el fragmento. El peso molecular sirve como marcador de referencia al tener fragmentos de ADN de distintos tamaños.



Lavado peritoneal de ratones.

Se trata de un procedimiento que nos permite obtener una muestra de leucocitos de ratón para su estudio. El protocolo es el siguiente:

1. Sacrificar ratón
2. Crucificar el ratón
3. Cortamos el pellejo, dos incisiones en diagonales, con cuidado de no rajar el peritoneo, que es lo que nos interesa
4. Inyectamos pbs en el peritoneo, pinchando superficialmente 5-6ml
5. Agitar el ratón suavemente
6. Se extrae el líquido peritoneal que sale turbio
 - *Se repiten estos tres pasos hasta obtener unos 20 ml de células
 - ** No pinchar vasos sanguíneos ni vísceras huecas para no perder células ni llenar de sangre la cavidad.
7. Cortamos el peritoneo para ver si tiene algún nódulo
8. Se centrifuga la muestra de 20 ml a programa de tripsinización
9. Tiramos el sobrenadante y nos quedamos con el pellet con las células.
10. Se cuentan las células en la cámara de Neubauer utilizando azul tripan.