

Curso Teórico-Práctico de Especialización
**"Curso de Cultivo Celular. Fundamentos Teóricos y Aplicaciones Diagnósticas.
Edición 2017."**

CIBICI (CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba

Curso de Formación Superior de Especialización dirigido a profesionales Bioquímicos, Farmacéuticos, Biólogos, Médicos, Odontólogos, Especialistas, alumnos de la Carrera de Especialidades Bioquímicas y otros profesionales de la Salud.

I- Fecha de realización: 19 al 23 y 27 al 30 de Setiembre de 2017.

II- Lugar de realización: El curso se desarrollará en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Las clases teóricas se dictarán en el Auditorio del Edificio de Ciencias II, y las clases prácticas en el Laboratorio de Cultivo Celular del edificio de Ciencias I, que cuenta con flujo laminar, estufa de cultivo, microscopio de fase invertida, y centrifugas. También se prevé el uso de la citocentrífuga del área de Inmunología del Departamento de Bioquímica Clínica, que será temporalmente trasladada al laboratorio de Cultivo Celular del edificio de Ciencias I.

III- Directores: Dr. Rubén D. Motrich (Prof. Adjunto, Inv. Adjunto, CIBICI-CONICET, FCQ-UNC).
Dra. Cinthia C. Stempin (Prof. Asistente, Inv. Asistente, CIBICI-CONICET, FCQ-UNC).

IV- Coordinadora de las Actividades Prácticas: Bioq. Paula A. Icely (CPA Profesional Adjunto CIBICI-CONICET, FCQ-UNC).

V- Colaboradores: 1- Dr. en Cs. Biológicas Cesar Germán Prucca (Inv. Asistente CONICET, Prof. Asistente, CIQUIBIC-CONICET y FCQ-UNC).
2- Dra. en Cs. Qcas. Ana Cristina Racca (Inv. Asistente CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC).
3- Dra. en Cs. Qcas. María Laura Breser (Inv. Asistente CONICET, CIT Villa María-CONICET, UNVM).
4- Dr. en Cs. Qcas. Nicolás Eric Ponce (Becario Postdoctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC).
5- Dra. en Cs. Qcas. Natalia Soledad Baez (Becaria Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC).
6- Bioq. Cristian Beccaria (Becario Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC).

7- Bioq. Facundo FioccaVernengo (Becario Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

8- Bioq. Florencia Celeste Salazar (Becaria Doctoral FONCyT, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

9- Bioq. Gloria Janet Godoy (Becaria Doctoral CONICET, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

10- Bioq. Liliana María Sanmarco (Becaria Doctoral CONICET, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

11- Bioq. Ximena Volpini (Becaria Doctoral CONICET, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

12- Lic. en Qca. Gabriela Furlán. (CPA CONICET, CIBCI-CONICET y FCQ-UNC).

VI- Objetivos:

El objetivo del curso es introducir los fundamentos teóricos y prácticos de las técnicas de cultivo celular eucariota y de la biología de la célula en cultivo, además de aportar una guía práctica de los procedimientos básicos a seguir para la realización de las metodologías empleadas.

El curso se desarrollará mediante clases teóricas y actividades prácticas en las que se discutirán los aspectos básicos de las técnicas más corrientemente utilizadas, así como las nuevas metodologías desarrolladas en el área. Se discutirá la aplicación del cultivo celular en investigación y como herramienta de diagnóstico para las diferentes necesidades de la práctica clínica.

En cuanto a las actividades prácticas, se entrenará a los alumnos en el manejo de las buenas prácticas del laboratorio de cultivo celular y en el manejo de diferentes líneas celulares en cultivo. Se realizarán cultivos de diferentes líneas celulares, cultivos en suspensión y de células adherentes. Los alumnos realizarán la purificación de células mononucleares de sangre periférica humana, a través de diferentes metodologías, para posteriormente utilizarlos en cultivo en ensayos para evaluar la respuesta linfoproliferativa antígeno-específica y frente a mitógenos. Además, los alumnos realizarán ensayos de transfección celular y de expresión ectópica de genes de relevancia para el diagnóstico clínico. Los alumnos aprenderán como preparar improntas para el diagnóstico clínico.

VII- Contenidos y actividades teórico-prácticas a realizar:

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA I. Día 1: Martes 19/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

Clase teórica I

a) Infraestructura y equipamiento mínimo. Diferentes áreas estériles. Niveles de seguridad. Tipos de cabinas de flujo laminar, estufas, autoclave, materiales y reactivos generales de uso común en el cultivo celular. Trabajo en condiciones asépticas y métodos de esterilización y desinfección. Controles físicos, químicos y biológicos de esterilización. Normas de Bioseguridad. Buenas prácticas de laboratorio de cultivo. Contaminaciones más frecuentes. Métodos de detección y monitoreo continuo. Conductas y procedimientos de saneamiento y prevención. 15:00 a 16:00 hs.

Café

b) Biología de la célula en cultivo. Ciclo celular. Morfología y Viabilidad. Requerimientos para su crecimiento: superficies aptas para el cultivo, composición de los medios de cultivo, suplementos y aditivos, constitución de la fase gaseosa, temperatura de incubación, etc. Condiciones de cultivo. Observación al microscopio de fase invertida. 16:30-17:30 hs.

Clase Práctica I

Familiarización con el laboratorio de cultivo celular. Ejercicio de las buenas prácticas de laboratorio de cultivo y obediencia de las normas de bioseguridad.

Manejo en la cabina de cultivo, pipeteo, organización del espacio, desecho de residuos. Demostración preparación de medios de cultivo. 17:45-19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA II. Día 2: Miércoles 20/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

Clase teórica II

Cultivos de líneas celulares y cultivos primarios.

a) Origen de los cultivos celulares. Cultivos primarios de diferentes orígenes (linfocitos, macrófagos, cardiomiocitos, fibroblastos, neuronas, etc.). Líneas celulares continuas. Cultivo de células adherentes y de células en suspensión. Clonado y Selección de tipos celulares. Concepto de Diferenciación y Transformación.

b) Manipulación de líneas celulares. Métodos de repiques y amplificación de cultivos celulares. Mantenimiento, congelación y descongelación de líneas celulares. Sistemas de detección de contaminación en cultivo celular. Detección de contaminación por mycoplasma. 15:00 a 16:30 hs.

Café

c) Diferentes ensayos para determinar la viabilidad celular (Azul de Tripán, MTT, etc.). Conteo y siembra de células. 17:00 a 17:30 hs.

Clase Práctica II

Observación al microscopio de líneas celulares adherentes y en suspensión. Técnicas simples de recuento celular y estimación de la viabilidad celular. Descongelación de líneas celulares. 17:45 a 19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA III. Día 3: Jueves 21/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

Clase Teórica III.

Ensayo de estimulación con LPS. Ensayo de viabilidad utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Procedimientos de siembra y cultivo. 15 a 15:30 hs.

Café

Clase Práctica III

Realización de cultivos de líneas celulares adherentes y en suspensión. Tripsinización de líneas celulares adherentes. Conteo, determinación de la viabilidad celular (utilizando colorantes supravitales), siembra de las células y monitoreo del cultivo. Observación y seguimiento en el microscopio de fase invertida. 16 a 19 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA IV. Día 4: Viernes 22/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

Clase teórica IV

Métodos de purificación y enriquecimiento de subpoblaciones celulares. Métodos físicos de separación celular basados en el tamaño celular y la velocidad de sedimentación. Separación con perlas magnéticas: diferentes estrategias de aislamiento. Separación mediante cellsorting utilizando citometría de flujo. Otras técnicas. 15:00 a 16:00 hs.

Café

Ensayo general de proliferación celular. Diferentes métodos: utilizando radioactivos, colorantes visibles y colorantes fluorescentes. Aplicaciones. Ensayos de citotoxicidad. Utilidad para el aislamiento de compuestos naturales y de síntesis química con potencial uso como antineoplásicos. Métodos para la determinación de apoptosis y necrosis celular. 16:30 a 17:30 hs.

Clase Práctica IV

Obtención de los resultados del ensayo del MTT. 17:45 a 19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA V. Día 5: Sábado 23/09/17 de 8:00 a 13:00 hs.

Clase Práctica V

1- Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana mediante lisis osmótica y gradientes de centrifugación Ficoll-Hypaque.

2- Cultivo de linfoproliferación antígeno-específica, frente a mitógenos y antígenos vacunales de memoria.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA VI. Día 6: Miércoles 27/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

Clase teórica V

El cultivo celular en la investigación y como herramienta diagnóstica. Estudios funcionales.

b) Ensayos para evaluar la función del linfocito B. Ensayos de linfoproliferación frente a estímulos clásicos y alternativos. Mitógenos. Parámetros de activación temprana del linfocito B. Producción de anticuerpos in vitro. 15:00 a 15:45 hs.

Café

c) Ensayos para evaluar la función del linfocito T. Ensayos de linfoproliferación frente a mitógenos y frente a antígenos específicos. Interpretación de los resultados. Producción de clones. Inducción y evaluación de la citotoxicidad. Dilución límite. ELISPOT. Determinación de marcadores de activación temprana del linfocito T. Determinación de la secreción de citocinas y otros mediadores inflamatorios (ON, ROS) en sobrenadantes de cultivo. 16:15 a 16:45 hs.

Clase Práctica VI

Estimulación de células con LPS para la determinación de mediadores inflamatorios [nitritos (ON)] en sobrenadantes de cultivo celular por métodos colorimétricos.

Ensayo de proliferación celular: observación de blastos al microscopio, cuantificación y procesamiento de los resultados. 17:00 a 19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA VII. Día 7: Jueves 28/09/17 de 15:00 a 19:00 hs.

El cultivo celular en la investigación y como herramienta diagnóstica. Generación de herramientas para el diagnóstico.

Clase teórica VI

a) Infección de células en cultivo con bacterias intracelulares y virus. Utilidades diagnósticas. Generación de improntas para el diagnóstico clínico. 15:00 a 15:45 hs.

Café

b) Generación de hibridomas B y dilución límite. Cultivo a micro y macro escala. Producción de anticuerpos monoclonales. Aplicaciones diagnósticas, terapéuticas e industriales. 16:15 a 17:00 hs.

Clase Práctica VII

Determinación de mediadores inflamatorios [nitritos (ON)] en sobrenadantes de cultivo celular por métodos colorimétricos.

Análisis de citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo (ELISA) y de la frecuencia de células secretoras de citoquinas (ELISPOT). Demostración con videos ilustrativos. 17:15 a 19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA VIII. Día 8: Viernes 29/09/17 de 16:30 a 19:00 hs.

Clase teórica VII

El cultivo celular en la investigación y como herramienta diagnóstica. Generación de herramientas para el diagnóstico.

a) Expresión ectópica de genes foráneos. Métodos de transfección celular. Utilidad en el diagnóstico clínico. Generación de improntas para el diagnóstico clínico. 16:30 a 17:30 hs.

Café

b) Diferenciación de células a otros linajes celulares. Generalidades. Condiciones de cultivo. Casos más utilizados. Condiciones de cultivo y requerimientos. Agentes químicos utilizados. Morfología y expresión de nuevos antígenos. Análisis de la diferenciación. Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas actuales y perspectivas a futuro. 18:00 a 19:00 hs.

ACTIVIDAD TEÓRICA-PRÁCTICA IX. Día 5: Sábado 30/09/17 de 8:00 a 13:00 hs.

Clase Práctica VIII

Transfección de líneas celulares en cultivo con un vector codificante para antígenos relevantes en el diagnóstico clínico (autoantígenos relevantes en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes). Metodología de la transfección. Determinación del grado de transfección y control de la expresión ectópica de los genes transfectados. Generación de las improntas para el diagnóstico clínico.

VIII- Metodología de la evaluación y aprobación del curso:

Al finalizar el curso, conviniendo la fecha con los alumnos y previa explicación de la

alumno se le plantearán diferentes situaciones problemáticas y necesidades diagnósticas que el alumno deberá ser capaz de resolver con los conocimientos adquiridos a lo largo del curso.

Para aprobar el curso, el alumno deberá haber asistido al 80% de las actividades teóricas y prácticas y haber aprobado la evaluación escrita con una calificación no inferior a 7 (siete).

IX- Preinscripción:

Enviar curriculum vitae en formato PDF (máximo 3 páginas) y formulario de preinscripción a: rmotrich@fcq.unc.edu.ar y cstempin@fcq.unc.edu.ar

La selección de los alumnos preinscriptos se realizará en base a los antecedentes presentados una vez cerrada la preinscripción.

X- Encuesta:

Al finalizar el curso, se realizará una encuesta anónima entre los asistentes a fin de evaluar el desempeño de los docentes, condiciones de las actividades desarrolladas, cumplimiento de las expectativas y sugerencias para posteriores ediciones.

XI- Bibliografía:

Djeu JY. monocyte/Macrophage Functions. Section E in Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. American Society for Microbiology, 1992.

Fletcher MA, Klimas N, Morgan R and Gjerset G. Lymphocyte proliferation. Section E in Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. American Society for Microbiology, 1992.

Freshney RI. Culture of animal cells. Second Edition. Wiley-Liss, Wiley and Sons, 1987.

Kruisbeek AM. In vitro assay for mouse lymphocyte function. Chapter 3, in Current Protocols in Immunology. Volume 1. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Stober W, eds. National Institutes of Health, Wiley and Sons, 1999.

Stites DP and Terr AI. Basic and Clinical Immunology. Seventh Edition. Appleton and Lange, 1991.

Strober W. Immunologic studies in humans. Chapter 7, in Current Protocols in Immunology. Volume 1. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Stober W, eds. National Institutes of Health. Wiley and Sons. 1999.