

Curso “Cultivo Celular: Fundamentos Teóricos y Aplicaciones Diagnósticas”

Del 10 al 13 y del 17 al 20 de junio de 2015. Horarios: miércoles a viernes, de 16 a 20.30; sábados de 8 a 13 horas. Lugar de clases teóricas: Auditorio de la FCQ (UNC), Planta baja, Edificio Integrador. Lugar de clases prácticas: Laboratorio de Cultivo Celular, Planta baja, Edificio Ciencias I. Facultad de Ciencias Químicas (UNC), Av. Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad

Universitaria (Córdoba). **Aprobado por Resolución HCD 241/2015.**

Cupos limitados: 25 personas.

Dirigido a:

Profesionales Bioquímicos, Farmacéuticos, Biólogos, Médicos, Odontólogos, Especialistas, alumnos de la Carrera de Especialidades Bioquímicas y otros profesionales de la Salud.

Objetivo:

Introducir al alumno en 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 y entrenamiento en los procedimientos básicos a seguir para la realización de las metodologías empleadas y sus aplicaciones en el diagnóstico clínico.

Plantel docente:

-Director: Dr. Rubén D. Motrich (Prof. Asistente, Investigador Asistente, CIBICI-CONICET; FCQ-UNC).

-Coordinadoras: Dra. Cinthia C. Stempin (Prof. Asistente, Investigador Asistente, CIBICI-CONICET; FCQ-UNC) y Bioq. Paula A. Icely (CPA Profesional Adjunto CIBICI-CONICET; FCQ-UNC).

-Docentes colaboradores: Dra. María Laura Breser (Becaria Post-Doctoral CONICET, CIT Villa María-CONICET, UNVM); Dr. Nicolás Eric Ponce (Becario Postdoctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC); Dr. César Germán Prucca (Inv. Asistente CONICET, Prof. Asistente, Dpto. de Química Biológica FCQ-UNC, CIQUIBIC CONICET); Bioq. Fabiola Velázquez (Becaria Doctoral CONICET, Prof. Asistente, Dpto. de Química Biológica FCQ-UNC, CIQUIBIC CONICET); Bioq. Jimena Tosello Boari (Becaria Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC); Bioq. Melisa Gorosito Serrán (Becaria Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC); Bioq. Leonardo Rodolfo Sánchez (Becario Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC); Lic. Fernando Canale (Becario Doctoral CONICET, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC); Bioq. María Soledad Miró (Becaria Doctoral CONICET, Prof. Asistente, CIBICI-CONICET y FCQ-UNC).

Modalidad: presencial. Teórico y práctico. Al finalizar el curso, conviniendo la fecha con los alumnos y previa explicación de la modalidad, se realizará una evaluación escrita obligatoria y en forma individual donde al 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).

Arancel: \$1.000 (incluido certificado).

Inscripciones: CERRADAS

Más información:

Dr. Rubén D. Motrich. E-mail: rmotrich@fcq.unc.edu.ar. Bioq. Paula A. Icely. E-mail: picely@fcq.unc.edu.ar

PROGRAMA:

MIÉRCOLES 10 DE JUNIO DE 2015 | 16 A 20.30 HS.

1. Introducción al cultivo celular.

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.

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. Métodos y condiciones de criopreservación.

2. 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. Manipulación de líneas celulares. Métodos de repiques y amplificación de cultivos celulares.

JUEVES 11 DE JUNIO DE 2015 | 16 A 20.30 HS.

2. Cultivos de líneas celulares y cultivos primarios.

b) 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 *cell sorting* utilizando citometría de flujo. Otras técnicas.

c) Diferentes ensayos para determinar la viabilidad celular (Azul de Tripán, MTT, etc.). Conteo y siembra de células. Condiciones de cultivo, etc.

VIERNES 12 DE JUNIO DE 2015 | 18 A 20.30 HS.

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

a) 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.

MIÉRCOLES 17 DE JUNIO DE 2015 | 18 A 20.30 HS.

3. 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*.

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. Manipulación y conservación de las muestras.

JUEVES 18 DE JUNIO DE 2015 | 16 A 20.30 HS.

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

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

b) Expresión ectópica de genes foráneos. Métodos de transfección celular. Utilidad en el diagnóstico clínico. Generación de improntas para el diagnóstico clínico.

c) 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.

VIERNES 19 DE JUNIO DE 2015 | 18 A 20.30 HS.

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

d) Generación de hibridomas B y dilución límite. Cultivo a micro y macro escala. Producción de anticuerpos monoclonales. Aplicaciones diagnósticas, terapéuticas e industriales.

Actividades prácticas:

VIERNES 12 DE JUNIO DE 2015 | 16 A 18 HS.

1- Familiarización con el laboratorio de cultivo celular. Ejercicio de las buenas prácticas de laboratorio de cultivo y obediencia de las normas de bioseguridad. 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. Ensayo de estimulación con LPS. Ensayo de viabilidad utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

SÁBADO 13 DE JUNIO DE 2015 | 8 A 13 HS.

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

3- Cultivo de linfoproliferación antígeno-específica, frente a mitógenos y antígenos vacunales de memoria. Observación de blastos y cosecha de cultivos. Procesamiento y discusión de los resultados.

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

5- Análisis de citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo (ELISA) y de la frecuencia de células secretoras de citoquinas (ELISPOT). Demostración con videos ilustrativos.

VIERNES 19 DE JUNIO DE 2015 | 16 A 18 HS.

6- Preparación de extendidos por citocentrifugación para ser utilizados como improntas para el diagnóstico clínico.

SÁBADO 20 DE JUNIO DE 2015 | 8 A 13 HS.

7- 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.

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.