



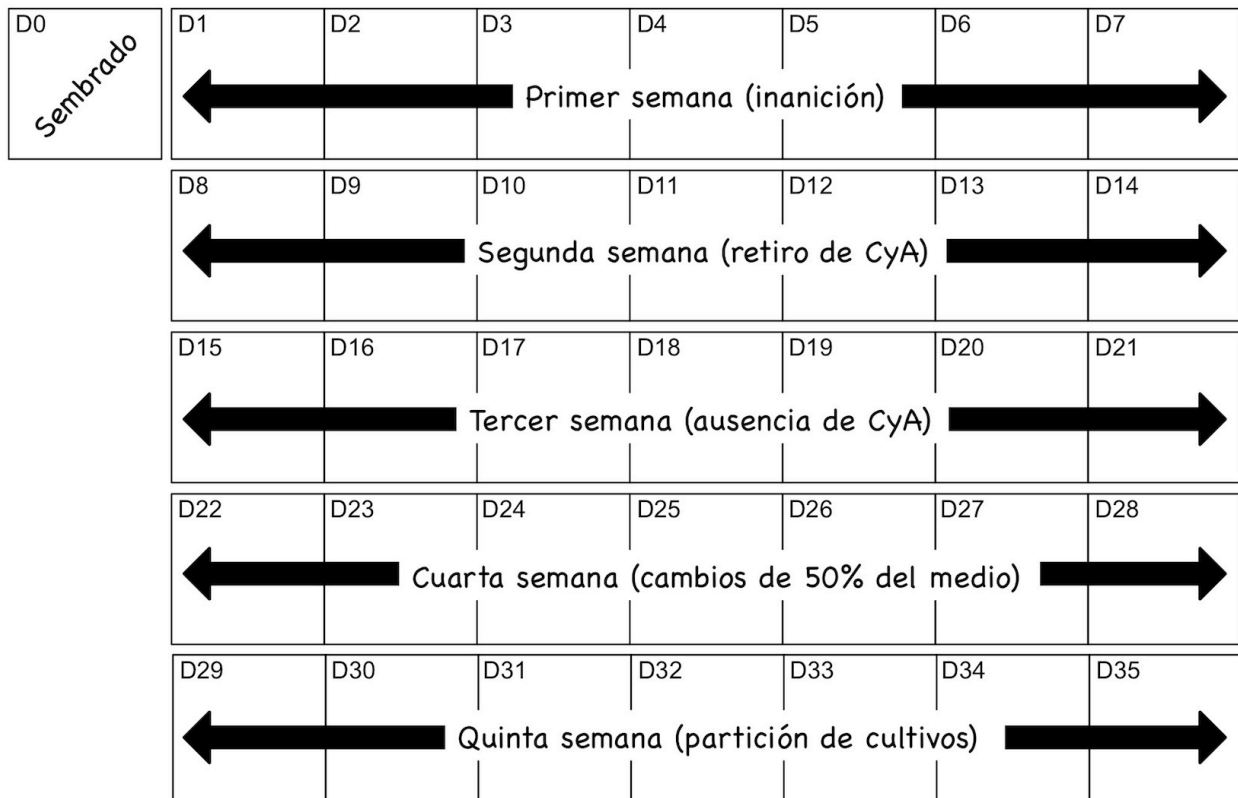
Transformación de CMN a Líneas Celulares B-Linfoblásticas (LCBL)

Created: Nov 6, 2008; Last modified: Mar 24, 2021, Version: 5.0

La transformación de células mononucleares (CMN) hacia líneas celulares permite contar con cantidades ilimitadas de DNA de individuos con características de especial interés por su constitución genética. Estas líneas celulares se obtienen mediante la infección de las CMN con Virus de Epstein Barr (EBV) lo cual permite su “inmortalización” y expansión indefinida. Las líneas celulares pueden mantenerse a -196°C por un largo plazo (años a décadas). El EBV se genera a partir de linfocitos B de la marmoseta Tití Cabeza blanca (*Sanguinus oedipus*) los cuales producen una gran cantidad de partículas virales (ver protocolo “*Expansión de LCBL y B95-8*”). Las partículas de EBV generadas son viables y poseen la capacidad de infectar a linfocitos humanos y producir Mononucleosis infecciosa y/o tumores hematológicos. **¡La manipulación de alícuotas o líneas celulares EBV-transformadas solamente deberá realizarse dentro del gabinete de seguridad biológica (GSB) localizado en el interior del cuarto de cultivo celular (CCC) y en apego a los lineamientos y disciplina correspondiente a un nivel de bioseguridad-3 !** Para conocer el procedimiento revise el protocolo multimedia disponible en YouTube <http://youtu.be/H0hiKgr8GHc>.

Mapa de Transformación de Líneas Celulares B-Linfoblásticas

Tal cual se lleva a cabo en el Laboratorio de Genómica viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP





Procedimiento de transformación empleando CMN frescas

1. Tras aislar las CMN es necesario contar y evaluar su viabilidad para ajustar su concentración a 2×10^6 células/mL empleando MB10% (RPMI-1640 con 10% de FBS) en un tubo de fondo redondo estéril. Las CMN deben tener una viabilidad superior a 75% para poder ser transformadas exitosamente. De lo contrario se deberán recuperar las CMN viables por separación en Ficoll.
2. Coloque una alícuota de 1 mL de ésta suspensión celular en un microtubo de 1.5 mL para servir como control positivo estimulado por fitohemaglutinina (PHA). Este paso es opcional y depende de la disponibilidad de CMN. Este paso podrá ser omitido para muestras críticas o de volumen limitado.
3. Con una micropipeta de P1000 agregue un volumen de sobrenadante de EBV equiparable al de la suspensión celular presente en el tubo de fondo redondo.
4. Incube a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad durante una hora, cada 15 minutos resuspenda por golpeteo digital a las células. Este paso, aunque surrealista, ha demostrado ser crítico.
5. Mezcle la suspensión celular gentilmente y distribuya alícuotas de 3 mL de la suspensión celular con sobrenadante de EBV a cada uno de los frascos de cultivo T25. La cantidad de frascos sembrada puede variar.
6. Adicione a cada frasco 3 mL de MB10% con Ciclosporina A (CyA) a una concentración final de 1 µg/mL. Se deberá continuar suplementando con CyA a 1 µg/mL por al menos 15 días.
7. Tape herméticamente el frasco y mezcle gentilmente SIN DERRAMAR SU CONTENIDO. Documente con microfotografías cada frasco a 10x y 25x con contraste de fase.
8. Desenrosque parcialmente la tapa del frasco (para permitir la difusión de gas) e incube verticalmente a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. Evalúe al microscopio cada tercer día y asiente sus hallazgos en el formato de transformación correspondiente.
9. Durante la primer semana (D1 a D7) las células no deberán ser alimentadas ni manipuladas fuera de las evaluaciones microscópicas.
10. Al día +7 la mayoría de los cultivos mostraran evidencia de transformación (cúmulos clonales o cambios morfológicos hacia un fenotipo epitelioides o fusiforme). Algunos cultivos podrán tardar más en mostrar cambios sugerentes de transformación (hasta 3 semanas). No deberá sorprender la cantidad abundante de detritus celulares durante esta primer semana. La CyA se incorpora a los cultivos para eliminar a los linfocitos T capaces de responder a la presencia de EBV destruyendo a las células B infectadas y en vías de transformación.





11. Durante la segunda semana (D8 a D14) los cultivos exitosamente transformados deberán ser alimentadas con MB10% suplementado con CyA a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración final. Esto se repite al menos cada 3er día o cuando el medio adquiera un color amarillo. Los cultivos que no tengan cambios sugerentes de transformación deberán continuar sin alimentación hasta que demuestren transformación. Algunos cultivos podrán tardar hasta 3 semanas en mostrar estos cambios. Un pequeño porcentaje de la población humana (2-5%) es resistente a la transformación por EBV y no generará líneas celulares (pero su control de PHA sí será estimulado, de allí la importancia de incorporar una alícuota para este control).
12. Para alimentar a las células durante la segunda semana es necesario llevar el MB10% a 37°C en baño maría y alimentar gota a gota a cada cultivo con una pipeta serológica de 10 mL estéril diferente.
13. Durante la tercer semana de cultivo (D15 a D21) se continúa alimentando con MB10% sin CyA cada tercer día o hasta que el medio adquiera un color amarillo. La CyA no debe ser eliminada repentinamente del medio de cultivo por lo que se ha ido retirando lentamente a lo largo de la 2da y 3er semana.
14. Durante la cuarta semana (D22 a D28) el cultivo celular será sometido a cambios de 50% del volumen de medio cada tercer día. Para esto se retiran cuidadosamente las cajas incubadas verticalmente y se colocan en el área de trabajo del Gabinete de Seguridad Biológica a una inclinación de 45 grados para permitir que las células se asienten en la orilla inferior (deben permanecer inclinadas al menos 5 minutos). Con una pipeta serológica de 10 mL se toma la mitad superior del medio de cultivo de cada frasco (cada frasco con una pipeta diferente) aspirando lentamente y descartando el sobrenadante recuperado hacia NaOCl al 0.1%. Con una pipeta serológica nueva se adiciona un volumen igual al retirado de MB10% fresco (previamente calentado a 37°C).
15. A la quinta semana (D29 a D35) los cultivos son sometidos a expansión volumétrica (partición de cultivo). Para ello se resuspenden homogéneamente las células y se siembran alícuotas de 5 mL en tantos frascos T25 nuevos como se deseen (empleando pipeta serológica de 10 mL). Posteriormente se complementa cada frasco sembrado (y el original) con 5 mL de MB10% fresco.
16. Al final de la quinta semana se podrá cerrar la línea celular para lo cual se deberá evaluar la viabilidad y concentración de células de cada frasco para repartir cuantas alícuotas de 5×10^6 células/mL se deseen criopreservar (ver protocolo de criopreservación de CMN y BLCL). En ocasión podrá ser necesario también separar una alícuota de 5×10^6 células/mL para extracción de DNA/RNA.
17. Es necesario asentar en la bitácora del laboratorio correspondiente la posición exacta de los crioviales (Tanque, Rack, Caja), fecha, concentración y viabilidad de las células almacenadas.





Procedimiento de transformación empleando CMN criopreservadas

1. Encienda el baño de agua y ajuste la temperatura a 37°C.
2. Encienda el GSB con antelación de 15 minutos para permitir el establecimiento del flujo de aire, prepare su área de trabajo, un recipiente con NaOCl al 0.1% y una bolsa de desechos.
3. Descongele una cantidad apropiada de MB 20% a 37°C (a razón de 10 ml por criovial) y añada 8 ml a un tubo de fondo redondo de 12 ml, previamente rotulado.
4. Luego de extraer los crioviales del tanque de LN2 (usando la protección adecuada: guantes, máscara y delantal) deberán pasar de inmediato al baño de agua a 37°C, donde se descongelarán por 2 minutos, agitando gentilmente.
5. Decante el contenido del criovial hacia el tubo de fondo redondo con 8 ml de MB 20% y, usando una micropipeta de P1000, enjuague el criovial con 1 ml de MB 20% y vierta su contenido en el tubo de fondo redondo. Deseche los crioviales vacíos en la bolsa para desechos dentro del GSB.
6. Mezcle gentilmente por inversión y centrifugue las muestras a 400 G (1600 rpm) por un período de 5 minutos, con aceleración rápida y desaceleración lenta. Se debe observar el pellet celular en el fondo del tubo, de lo contrario repita este paso hasta que se visualice.
7. Decante el volumen excedente hacia el recipiente con NaOCl al 0.1% y resuspenda el pellet celular en 1 ml de MB 20% a 37°C.
8. Proceda a realizar el conteo y viabilidad celular en hemocitómetro con azul de tripán a una dilución 10:1 (90 μ l de azul tripán + 10 μ l de la suspensión celular). La concentración celular necesaria para la transformación debe ser de 2×10^6 a 10×10^6 cél/ml. (Por lo regular los crioviales de nuestro laboratorio se encuentran a una concentración de alrededor de 5×10^6 cél/ml). Así mismo, se requiere una viabilidad mayor a 75% para que la transformación sea exitosa.
9. Incube las CMN en el tubo de fondo redondo por al menos 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.
10. Centrifugue las muestras a 400 G (1600 rpm) por 5 minutos y decante el volumen excedente al recipiente con NaOCl al 0.5% **CONSERVANDO ÚNICAMENTE EL PELLETT CELULAR.**
11. Descongele en baño de agua a 37°C agitando por 2 minutos, 2 crioviales de sobrenadante EBV por cada muestra de CMN descongeladas a transformar.
12. Empleando una micropipeta P1000, transfiera el contenido del criovial de EBV al tubo de fondo redondo que contiene el pellet celular y deseche el criovial y tapa hacia el recipiente con NaOCl al 0.1%. Resuspenda por golpeteo digital.





13. Incube a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad durante una hora, resuspendiendo por golpeteo digital cada 15 minutos. Éste paso es crucial para la transformación exitosa de las células.
14. Distribuya alícuotas de 1 ml por pocillo en una placa de cultivo p24. Por lo regular se necesitan 3 pocillos por muestra.
15. Añada un volumen equiparable (1 ml) de MCB 20% a 37°C y 4µl de PHA a cada pocillo, para una concentración final de 2µg/mL.
16. Tape y rotule las multiplacas apropiadamente y fotodocumente en microscopio a 10x y 25x. Por último, llene los formatos de transformación correspondientes.
17. Durante la primer semana (D1 a D7) las células no deberán ser alimentadas ni manipuladas fuera de las evaluaciones microscópicas.
18. Al día +7 la mayoría de los cultivos mostraran evidencia de transformación (cúmulos clonales o cambios morfológicos hacia un fenotipo epiteliode o fusiforme). Algunos cultivos podrán tardar más en mostrar cambios sugerentes de transformación(hasta 3 semanas). No deberá sorprender la cantidad abundante de detritus celulares durante esta primer semana.
19. Durante la segunda semana (D8 a D14) se realizará la partición de cultivo tomando 1 ml de cada pocillo y transfiriéndolo a uno adyacente. Posteriormente se agregará 1 ml de MB10% a 37°C y 2 µl de PHA por pocillo para una concentración final de 1 µg/mL. Esto se repite al menos cada 3er día o cuando el medio adquiera un color amarillo. Los cultivos que no tengan cambios sugerentes de transformación deberán continuar sin alimentación hasta que demuestren transformación. Algunos cultivos podrán tardar hasta 3 semanas en mostrar estos cambios. Un pequeño porcentaje de la población humana (2-5%) es resistente a la transformación por EBV y no generará líneas celulares (pero su control de PHA sí será estimulado, de allí la importancia de incorporar una alícuota para este control).
20. Para alimentar a las células durante la segunda semana es necesario llevar el MB10% a 37°C en baño maría y alimentar gota a gota a cada cultivo con una pipeta serológica de 10 mL estéril diferente.
21. Durante la tercer semana de cultivo (D15 a D21) se transfiere el contenido de los pocillos a un frasco de cultivo T25 y se agrega MB10% a 37°C sin PHA hasta que alcanzar una coloración rosada (aproximadamente un volumen equiparable a la suspensión celular). Se continuará alimentando con MB10% sin PHA cada tercer día o hasta que el medio adquiera un color amarillo. La PHA no debe ser eliminada repentinamente del medio de cultivo por lo que se ha ido retirando lentamente a lo largo de la 2da y 3er semana.





22. Durante la cuarta semana (D22 a D28) el cultivo celular será sometido a cambios de 50% del volumen de medio cada tercer día. Para esto se retiran cuidadosamente las cajas incubadas verticalmente y se colocan en el área de trabajo del Gabinete de Seguridad Biológica a una inclinación de 45 grados para permitir que las células se asienten en la orilla inferior (deben permanecer inclinadas al menos 5 minutos). Con una pipeta serológica de 10 mL se toma la mitad superior del medio de cultivo de cada frasco (cada frasco con una pipeta diferente) aspirando lentamente y descartando el sobrenadante recuperado hacia NaOCl al 0.1%. Con una pipeta serológica nueva se adiciona un volumen igual al retirado de MB10% fresco a 37°C.
23. A la quinta semana (D29 a D35) los cultivos son sometidos a expansión volumétrica (partición de cultivo). Para ello se resuspenden homogéneamente las células y se siembran alícuotas de 5 mL en tantos frascos T25 nuevos como se deseen (empleando pipeta serológica de 10 mL). Posteriormente se complementa cada frasco sembrado (y el original) con 5 mL de MB10% fresco a 37°C.
24. Al final de la quinta semana se podrá cerrar la línea celular para lo cual se deberá evaluar la viabilidad y concentración de células de cada frasco para repartir cuantas alícuotas de 5×10^6 células/mL se deseen criopreservar (ver protocolo de criopreservación de CMN y BLCL). En ocasión podrá ser necesario también separar una alícuota de 5×10^6 células/mL para extracción de DNA/RNA.
25. Es necesario asentar en la bitácora del laboratorio correspondiente la posición exacta de los crioviales (Tanque, Rack, Caja), fecha, concentración y viabilidad de las células almacenadas.

Notas

1. La PHA estimula la mitosis y proliferación de las CMN. Cada botella de PHA liofilizada debe reconstituirse inyectando (con aguja y jeringa estéril) 5 ml de PBS a 37°C. La concentración final de la solución Stock es de 1 mg/ml, por lo que se agregan 4 μ L por pocillo durante la primera semana (concentración requerida: 2 μ g/ml) y posteriormente 2 μ L por pocillo durante la segunda semana (concentración requerida: 1 μ g/ml) hasta retirarla por completo durante la tercera semana.
2. Cuando se transfieren a frasco T25 pueden crecer más rápidamente. Se debe monitorizar la coloración del medio y realizar pases cada 48-72 horas. Puede disminuirse gradualmente la concentración de FBS.





Referencias

1. Mayor N, Anthony Nolan Research Institute. Protocol for growing B-Lymphoblastoid Cell Lines.
2. Gorodezky C, et al. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), 2007.

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Optimized protocol.
- 3.0 Optimized protocol.
- 4.0 Optimized protocol
- 5.0 Changes to document format only.

