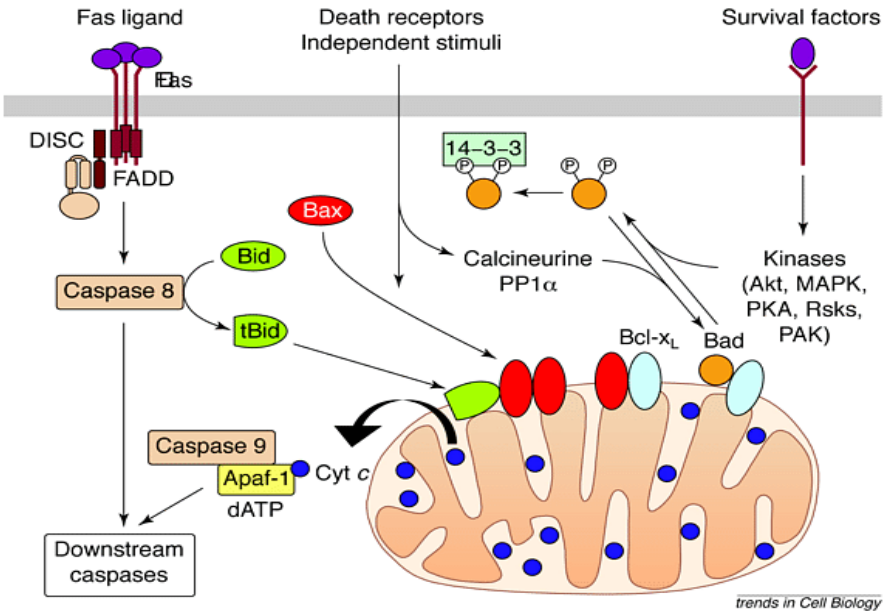
TÓPICO ESPECIAL EN INMUNOLOGÍA:

TÉCNICAS PARA INDUCIR Y CUANTIFICAR LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE



RESPONSABLES: **SIHAM SALMEN**
LÉRIDA BORGES
LISBETH BERRUETA (COORDINADORA)

DEFINICIÓN

Se trata de un curso intensivo de 40 horas de duración, dirigido a profesionales y estudiantes de postgrado en el área de Biomedicina, cuya finalidad es revisar conceptos fundamentales relacionados con el fenómeno de muerte celular programada y practicar técnicas utilizadas en el laboratorio de inmunología celular, para inducir y medir la apoptosis en células del sistema inmune.

JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años hemos presenciado un verdadero estallido en lo que respecta al interés y al conocimiento generado sobre la apoptosis, el fenómeno mediante el cual una célula sufre un proceso activo de suicidio o muerte celular programada. Se sabe actualmente que la apoptosis es esencial en muchos aspectos del desarrollo normal y es requerida para el mantenimiento de la homeostasis tisular. Las condiciones en las cuales existe una falla en la modulación de este proceso, pueden resultar en consecuencias catastróficas para el organismo. En el cáncer así como también en muchas otras enfermedades tales como: el SIDA, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el infarto al miocardio, etc. se ha descrito que la pérdida del control del fenómeno de apoptosis constituye un elemento fundamental.

Por estas razones, en todas las profesiones relacionadas con la Biomedicina es fundamental la comprensión de los mecanismos y bases moleculares que modulan este fenómeno y el empleo de estrategias en el laboratorio para su manipulación y detección, constituyéndose en herramientas de invalorable utilidad tanto en el diagnóstico como en el seguimiento y pronóstico de muchas enfermedades.

OBJETIVO GENERAL

Revisar conceptos teóricos y técnicas para medir e inducir la apoptosis en células del sistema inmune, sus aplicaciones en el laboratorio de Inmunología celular y su repercusión en la inmunopatogenia de las enfermedades.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Profundizar en los mecanismos moleculares moduladores de la apoptosis.

2.-.Describir las técnicas utilizadas en el laboratorio para inducir la apoptosis en células del sistema inmune

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

3.-Destacar la utilidad de la Citometría de flujo como herramienta fundamental en el estudio de la apoptosis

4.-Describir y practicar en el laboratorio la cuantificación de la apoptosis mediante tinción del ADN con Ioduro de propidio y análisis por citometría de Flujo

5.- Describir la técnica de marcaje con Annexina V en la medición de la apoptosis y su análisis mediante citometría de Flujo.

6.- Medir mediante citometría de Flujo la expresión espontánea o inducida de las moléculas Fas y FasL en células del sistema inmune

6.- Analizar la vía mediada por el complejo Fas/FasL en la apoptosis de células linfoides y medir la apoptosis mediada por esta vía mediante citometría de flujo.

7.- Definir e ilustrar mediante ejemplos la apoptosis celular espontánea

CONTENIDO PROGRAMÁTICO Y MÉTODOS DE ENSEÑANZA

Lunes **21/11/05**	**Martes** **22/08/03**	**Miércoles** **13/08/03**	**Jueves** **14/08/03**	**Viernes** **13/08/03**
Bienvenida. Aspectos celulares y moleculares del fenómeno de apoptosis Lisbeth Berrueta 8:30 am.-10:00am Apoptosis en células del sistema inmune, herramientas utilizadas para su medición Siham Salmen 10:15am-11:15 am Citometría de flujo como herramienta para la medición de la apoptosis Lérida Borges 11:30pm-12:30pm	**Mañana** 1.Discusión de protocolo de trabajo. 2.Purificación de células (PMNs) 3. Dejar células en cultivo para medir apoptosis espontánea e inducida vía Fas durante 6 y 24 horas de incubación 4. Inducción y medición de la expresión de Fas/FasL a través de la incubación de las células con estímulos policlonales (Phorbol 12-myristate-13acetate (PMA))	**Mañana** 1.Discusión de protocolo de trabajo. 2. Medición de apoptosis espontánea e inducida vía Fas en PMN mediante tinción con Ioduro de propidium, Annexina V y anaranjado de acridina	**Mañana** 1.Discusión de protocolo de trabajo. 2. Medición de apoptosis inducida vía Fas, en células linfoides mediante tinción con Ioduro de propidium, Annexina V y anaranjado de acridina	**SEMINARIOS DE LOS PARTICIPANTES**

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

Tarde 1. Discusión de protocolo de trabajo 2. Purificación de células de sangre periférica 3. Desarrollo de protocolo para medir perfil de ADN en PMN y PBL mediante tinción con Ioduro de propidium 4. Inicio de tratamiento de J77 con anti-fas (anticuerpo anti-Fas clona CH11)	***Tarde*** 1. Discusión de protocolo de trabajo 2. Medición de la apoptosis espontánea e inducida vía Fas después de incubación por 6 h, mediante Annexina V, PI y anaranjado de acridina. 3. Análisis y discusión de resultados mediante citometría de flujo	***Tarde*** 1. Discusión de protocolo de trabajo 2. Medición de la inducción de apoptosis mediada por anti-Fas en J77, después de 48 horas de incubación 3. Discusión de resultados	***Tarde*** 1. Discusión de protocolo de trabajo 2. Medición de la inducción de apoptosis mediada por anti-Fas en células linfoides **3. Discusión de resultados**	

CRITERIOS Y TÉCNICAS DE EVALUACIÓN:

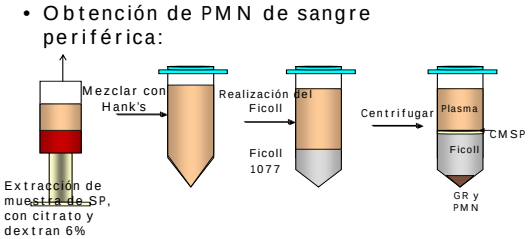
Este curso tendrá evaluación continua y finalmente se les solicitará a los estudiantes la presentación de un seminario en temas relacionados y el desarrollo de un examen fuera del aula en referencia a problemas biológicos relacionados con el tópico.

PROTOCOLOS DE TRABAJO

PURIFICACIÓN DE POLIMORFONUCLEARES.

Purificación mediante sedimentación por dextrán

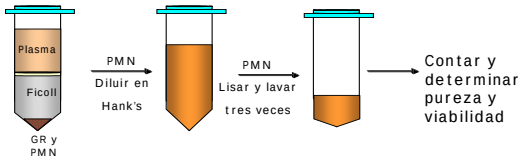
- Extracción de 20 ml se sangre periférica en inyectadora de 60 ml, la cual contiene 3 ml de Dextran al 6% (1,5 por cada 10 ml de sangre) diluido en solución salina 0,9% estéril y 2 ml de citrato de sodio (1 ml por cada 10 ml de sangre).
- Colocar la jeringa en posición vertical durante 30'a temperatura ambiente (TA).



- **Obtención del sobrenadante libre de glóbulos rojos y realización del ficoll proporción 3:1**

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

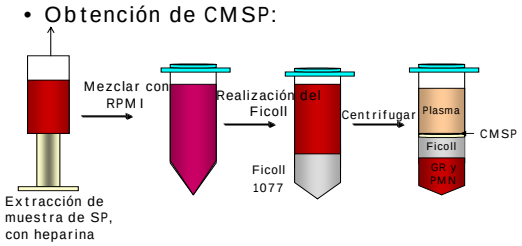
- **Centrifugar a 1800 rpm por 30 minutos a 18-21°C**
- **Descartar todo el sobrenadante y usar el sedimento de PMN con glóbulos rojos remanentes**
- Resuspender en 500 ul RPMI al paquete celular (PMN y restos de G.R.) para transferirlo a otro tubo limpio (a partir de este momento las células y los medios deben mantenerse en frío para evitar la agregación celular)



- Lisar tres veces con 1ml de H_2O destilada estéril y fría, por 30 segundos y restituir la osmolaridad con RPMI.
- Resuspender las células en 1 ml de RPMI
- Medir viabilidad, pureza celular y realizar el contaje celular
    - Para cuantificar el número de células por ml y además determinar la viabilidad, realizar una dilución 1:100 (2 ml de células en 198 ml de Trypan Blue, diluido 1:10 en PBS y contar en la cámara de Newbauer
- Ajustar a $2x10^6$/ml en RPMI+SBF al 10%.

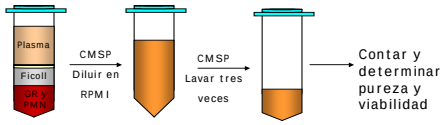
PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

- Extracción de 20 ml se sangre periférica heparinizada (50U/ml),.
- **Diluir en RPMI a partes iguales y realización del ficoll proporción 3:1**



- Tomar la interfase del ficoll que es la capa de mononucleares (PBL) y trasladarlo a un tubo falcon limpio y colocarlo en frío.

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87



- Lisar con 1ml de H_2O destilada estéril por 30 segundos y restituir la osmolartidad con RPMI, si hay glóbulos rojos contaminantes.
- Lavar tres veces y resuspender las células en 1 ml de RPMI
- Medir viabilidad y pureza celular, realizar el contaje celular .(tanto de PBL como PMN)
    - Para cuantificar el número de células por ml, realizar una dilución 1:100 (2 ml de células en 198 ml de Trypan Blue diluido 1:10 en PBS, y contar en la cámara de Newbauer
- Ajustar a $2x10^6$/ml en RPMI+SBF al 10%.

PROTOCOLO PARA MEDIR TINCIÓN DE DNA EN LINFOCITOS Y CUANTIFICACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

1. Resuspender $2x10^6$ en 1 cc PBS
2. Colocar en vortex y agregar gota a gota 1cc de etanol frío (almacenado a –20ºc)
3. Incubar por 15 min a –20 ºC
4. Lavar dos veces con PBS
5. Agregar 5 µl RNAsa
6. Incubar a 37 ºC por 15 min
7. Agregar 5 PI µl, incubar en oscuridad por 15 min
8. Leer en el citómetro

- **PROTOCOLO PARA MEDIR TINCIÓN DE DNA EN PMN Y CUANTIFICACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

1. Previa purificación y posterior al sometimiento a diferentes condiciones los PMN se centrifugan a 2000rmp por 5 min y se fijan con PAF por 10 minutos a TA
    a. Paraformaldehído al 1%: pesar 0,1 gr de PAF y diluirlo en 9 ml de agua, calentar hasta que se disuelva y luego agregar 1 ml de PBS 10X)
2. Lavar tres veces 2000 rpm x 5 min
3. Permeabilizar con 1 ml de saponina 0.05% en PBS con 0.1% BSA por 20 min a TA
4. Centrifugar 2000 rpm por 5 min, descartar el sobrenadante y agregar 100 l PBS-EDTA y 5 ul RNasa e incubar 15 min a 37ºC
5. Agregar 5 l PI a TA por 15 min en oscuridad.
6. Mantener protegido de la luz hasta el momento de leer en citómetro.

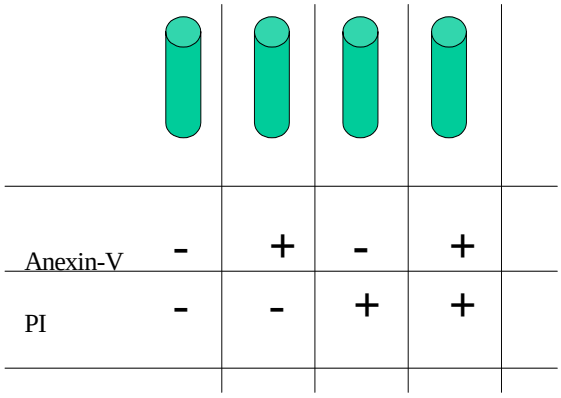
Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

PROTOCOLO PARA MEDIR TINCIÓN DE DNA EN PBLs Y CUANTIFICACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

1. Previa purificación y posterior al sometimiento a diferentes condiciones los PBLs se centrifugan a 2000rmp por 5 min
2. Las células son resuspendidas en 100 ml de solución hipotónica (Citrato de Sodio, Triton X100, PI y agua destilada)
3. Agregar 5 l de PI y 5 l de RNAsa e incubar a 37°C por 30 minutos, protegido de la luz
4. Mantener protegido de la luz hasta el momento de leer en citómetro.

PROTOCOLO PARA LA TINCIÓN CON ANEXINA-V

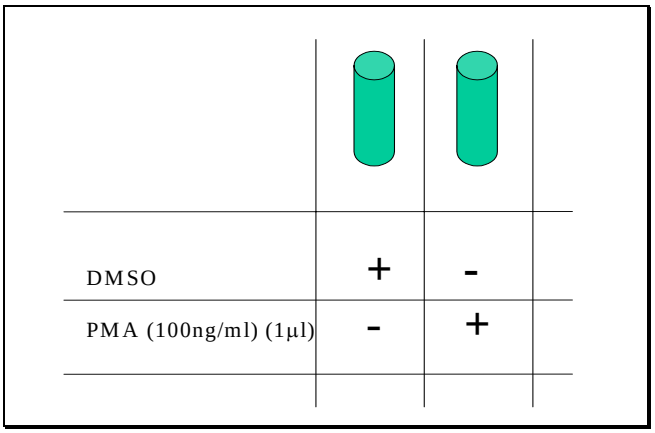
1. Previa purificación y posterior al sometimiento a diferentes condiciones las células se centrifugan a 2000rmp por 5 min
2. Se resuspenden en 100ul de buffer de unión del kit de Annexina-V (Santa Cruz Biotechnology)
3. Se añade 2,5 l de Annexina-V-FITC y 5 l de PI a cada tubo según protocolo anexo:



4. Mezclar e incubar por 15 minutos a TA, protegido de la luz
5. Finalmente agregar 400ul de buffer unión y leer en el citómetro.

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

PROTOCOLO PARA INDUCIR LA EXPRESIÓN DE FASL EN PMN

1. Previa purificación y ajustadas a las células (PMN) a una concentración de $2x10^6$ cel/ml, en RPMI-SBF al 10%, se procede a estimular por 1 hora para inducir la expresión de FasL, siguiendo el protocolo anexo:
2. Protocolo:
3. 

4. Finalizado el tiempo de incubación colocar en hielo y agregar 1 ml de PBS-EDTA frío y centrifugar a 2000 rpm por 5 min.
5. Resuspender con 200 ul PBS-EDTA con BSA 1% frío y agregar a cada tubo los monoclonales correspondientes :
    a. 3 ul CD95 L-biotinilado incubando por 30 min en hielo y oscuridad.
    b. Lavar tres veces con PBS EDTA , centrifugar y marcar ahora con 1 ul Estreptavidina-PE por 30 min en oscuridad y en hielo.
6. Lavar tres veces con PBS –EDTA.
7. Decantar y fijar con 1 ml PAF al 1 %, por 10 minutos a TA
8. Lavar 3 veces con PBS-EDTA y resuspender en 300 ul de PBS-EDTA.
9. Adquirir en el citómetro

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS ESPONTÁNEA EN POLIMORFONUCLEARES

1. Luego de la extracción y purificación de los PMNs
2. Ajustar las células a $2x10^6$/ml en RPMI-10% suero bovino fetal
3. Colocar las células en una placa de 48 pozos e incubarlas en la estufa a 37°C con 5% CO_2 por 6 y 24 horas
4. Finalizada la incubación, teñir las células mediante el procedimiento descrito de tinción con ioduro de propidium y con Annexina-V

PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS INDUCIDA VÍA FAS EN POLIMORFONUCLEARES

1. Ajustar las células a $2x10^6$/ml en RPMI-10% Suero bovino fetal
2. Colocar las células en una placa de 48 pozos, y estimular con 200ng/ml de anti-Fas (CH-11) e incubarlas en la estufa a 37°C con 5% CO_2 por 6 y 24 horas, según protocolo anexo

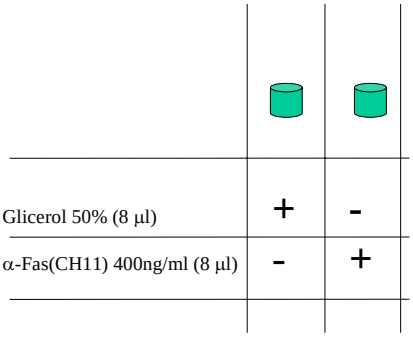
Glicerol 50% (4 µl)	+	-
α-Fas(CH11) 200ng/ml (4 µl)	-	+

3. Finalizada la incubación, teñir las células mediante el procedimiento descrito de tinción con ioduro de propidium y con Annexina-V (Kit Santa Cruz, Biotechnology).

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87

PROTOCOLO PARA LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS INDUCIDA VÍA FAS EN JURKAT

4. Ajustar las células a $2x10^6$/ml en RPMI-10% Suero bovino fetal
5. Colocar las células en una placa de 48 pozos, y estimular con 400ng/ml de anti-Fas (CH-11) e incubarlas en la estufa a 37°C con 5% CO_2 por 48 horas, según protocolo anexo



6. Finalizada la incubación, teñir las células mediante el procedimiento descrito de tinción con Ioduro de propidium y con Annexina-V (Kit Santa Cruz, Biotechnology).

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA Y COMPLEMENTARIA:

1. Zhu et al. Apoptosis detection and assay methods. Biotechniques books. Eaton Publising . 1998.
2. JJ Cohen. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. J Allergy Clin Immunol, Apr 1999; 103(4): 548-54.
3. PH Krammer . CD95's deadly mission in the immune system**.** Nature, Oct 2000; 407(6805): 789-95.
4. Andreas Krueger, Sven Baumann, Peter H. Krammer, and Sabine Kirchhoff . FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. Mol. Cell. Biol., Dec 2001; 21: 8247 - 8254.

Edificio Louis Pasteur. Al lado del I.A.H.U.L.A.
Mérida 5101. Apartado Postal Nº 566
Tlf. Oficina 274- 240.3199 – 31.87 – 32.11 Fax 58-274-240.32.12 / 240.31.87