



SINCRONIZACIÓN DE CÉLULAS ANIMALES MEDIANTE ELUTRIACIÓN CENTRÍFUGA

José Antonio Serrato*, Patricia Gorocica Rosete*, Raquel Guinzberg[#], Vanessa Hernández[§]. *Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), D.F., C.P. 14080. [#]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, D.F., C.P. 04510. [§]Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mor. C.P. 62250. serratoiner@gmail.com

Palabras clave: elutriación, células animales, ciclo celular.

Introducción. Durante la etapa de crecimiento exponencial los cultivos celulares operan en crecimiento balanceado, sin embargo, las células no se duplican de forma sincronizada, es decir, la población celular se encuentra segregada en las diferentes fases del ciclo celular. En tales condiciones sólo es posible estudiar cada uno de los procesos celulares de forma global. Cuando se pretende, por ejemplo, estudiar el proceso de producción y glicosilación de proteínas detalladamente a lo largo de las diferentes etapas de un ciclo de división celular es necesario entonces sincronizarlas (1).

De los diferentes procedimientos existentes para la obtención de células sincronizadas, la elutriación por centrifugación representa el mejor procedimiento para obtener poblaciones con un alto grado de sincronización, en alta concentración celular y con las mínimas perturbaciones a la viabilidad y fisiología de las células. Sin embargo, debido a su principio de operación, es necesario definir con precisión los parámetros de separación para cada línea celular en particular si se desea conseguir una sincronización exitosa (2). El objetivo del presente trabajo fue la obtención de poblaciones de células animales altamente sincronizadas en las diferentes fases del ciclo celular mediante el procedimiento de elutriación centrífuga.

Metodología. Se cultivaron células animales en frascos T-225 cm² con 50mL de medio de cultivo a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%. La concentración celular se determinó usando una cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión con azul de tripano. Células en crecimiento exponencial (10⁷) se cosecharon y concentraron a un volumen de entre 5-10 mL para su posterior separación por elutriación. La elutriación se realizó en una centrífuga Beckman J2-21 de acuerdo al procedimiento descrito por Banfalvi, (2008) (3). La determinación de la fase del ciclo celular se realizó en base al contenido de DNA mediante tinción con Ioduro de Propidio y cuantificado por citometría de flujo en un citómetro FacsCalibur (Beckton Dickinson) de acuerdo a la metodología descrita por Ormerod, (2000) (4).

Resultados. En la Fig. 1 se muestra una cinética típica de crecimiento de hibridomas muestreado cada 24 h. Se determinó que el tamaño, la complejidad celular y el contenido de DNA cambian a lo largo del cultivo. Además, en la etapa final del cultivo hay un incremento significativo en la complejidad celular.

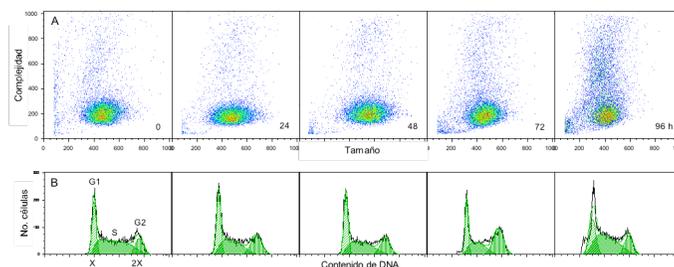


Fig. 1. Distribución celular y contenido de DNA en una cinética de crecimiento típica de hibridomas. A) Dot plot de tamaño vs granularidad; B) Distribución de contenido de DNA teñido con Ioduro de Propidio.

Se determinó que el tiempo óptimo para cosechar las células a sincronizar debe ser entre las 24 y 48 h, que es el tiempo en el cual la complejidad celular es menor y cuando la población en la fase G1 del ciclo celular alcanza su máximo valor (véase **Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentajes de la población celular en cada una de las fases del ciclo celular en una cinética de crecimiento típica de hibridomas.

Fase del ciclo celular (%)	Tiempo de cultivo (h)				
	0	24	48	72	96
G1	27.1	32.7	34.0	26.1	26.0
S	56.7	40.5	43.9	30.6	52.6
G2	16.1	27.2	22.7	42.6	18.0

Conclusiones. El tamaño, granularidad y porcentaje de las poblaciones de ciclo celular cambia durante el cultivo. El tiempo óptimo para sincronización por elutriación debe ser entre las 24 y 48 h de cultivo.

Agradecimientos. Al Dr. Enrique Piña (Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM) por facilitar el uso del sistema de elutriación. A la T. Lab. Rosa Nieto por su asistencia técnica. Al presupuesto para Investigación en Salud INER-2010.

Bibliografía.

- Cooper S. (2003) Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1099-1106
- Gillespie D.A.F. and Henriques C. (2006). Centrifugal elutriation as a means of cell cycle phase separation and synchronisation. En: *Reviews and protocols in DT40 Research*. Buerstedde J.-M. and Takeda S. (eds.) Springer, USA. 359-361.
- Banfalvi G. (2008) Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat. Protocols.* 3 (4): 663-673.
- Ormerod M.G. (2000) Análisis de DNA – general methods. En: *Flow Cytometry A Practical Approach, Third Ed.* Ormerod M.G. (Ed.) Oxford University Press, Inc., New York, NY. USA, pp. 83-96.