GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR RECOMBINANTE SWAN 71-GFP DESTINADA AL DESARROLLO DE ENSAYOS IN VITRO

Jimenez Metz, Camila
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, UNL-CONICET)
Abud, Julian; *Rodríguez, Horacio*
Ciencias Biológicas
Palabras claves: Swan 71, GFP, trofoblastos

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de la placenta, se producen cambios importantes en la vasculatura uterina materna, que aumentan el flujo sanguíneo hacia el espacio intervelloso. Las arterias espiraladas uterinas suministran sangre oxigenada a la placenta en crecimiento, y su remodelación condiciona el flujo sanguíneo de la madre al feto (Lyall et al. 2013). Un tipo de célula fundamental en esta remodelación es el trofoblasto. Las células del trofoblasto extravelloso (EVT) proliferan e invaden el endometrio decidualizado de manera intersticial y endovascular (Whitley et al. 2010). Una invasión inadecuada de los trofoblastos en la vasculatura materna puede llevar a complicaciones del embarazo como pérdida temprana, restricción del crecimiento intrauterino y preeclampsia.

Swan 71 es una línea celular de trofoblastos humanos del primer trimestre de embarazo, una herramienta clave para el estudio de factores y estrategias que afectan los procesos de invasión e implantación embrionaria (Straszewski-Chavez et al. 2009; Abud et al. 2024). Los estudios que utilizan células primarias aisladas de su entorno *in vivo* o líneas celulares derivadas de ellas, son cruciales para entender la invasión del trofoblasto y su interacción con células vasculares. Sin embargo, el cultivo en monocapa puede alterar el comportamiento celular al destruir interacciones tridimensionales. Para superar esto, se han desarrollado modelos de cultivo in vitro más complejos, como sistemas de cultivo celular tridimensionales (3D). Actualmente, existen numerosos avances en estos sistemas, desde simples esferoides hasta modelos más complejos de órganos en chips, y modelos 3D de co-cultivo equipados con control de flujo microfluídico (Wang H. et al. 2021). Este tipo de sistema de cultivo, ofrece una mejor representación del entorno natural experimentado por las células bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas, mostrando un mayor potencial para evaluar la disposición y farmacocinética de fármacos que afectan la seguridad y eficacia en las etapas tempranas de desarrollo (Wang et al. 2021; Kimura et al. 2018).

Por otro lado, la proteína verde fluorescente (GFP) es una proteína pequeña de 26 kDa que se utiliza como reportera debido a su capacidad de emitir luz a 510 nm cuando es estimulada con luz UV. Esta propiedad facilita el seguimiento, visualización y la comprensión del comportamiento y la migración de las células en un entorno tridimensional.

OBJETIVOS

- Obtención y purificación de vectores de expresión de GFP para realizar la transfección.
- Optimización de la transfección con polietilenimina (PEI) y un vector de expresión de GFP (pIRES2-AcGFP1), utilizando la línea celular CHO-K1
- Optimización de la transfección con polietilenimina (PEI) y un vector de expresión de GFP (pIRES2-AcGFP1), utilizando células Swan71.

Título del proyecto: PLATAFORMAS ÓRGANOS-EN-CHIPS DE PROCESOS CRÍTICOS EN BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y SUS APLICACIONES EN SALUD HUMANA
Instrumento: PICT aplicados
Año convocatoria: 2021
Organismo financiador: Agencia I+D+i, FONCYT
Director: Rodriguez, Horacio Adolfo

METODOLOGÍA

El ADN puede introducirse en una célula huésped mediante transfección con lípidos catiónicos cómo la polietilenimina o PEI, un polímero catiónico estable. Este compuesto condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se unen a las superficies celulares aniónicas. Como resultado, el complejo ADN es endocitado por las células y el ADN se libera en el citoplasma. De esta manera, es posible introducir vectores de expresión de proteínas, como la proteína verde fluorescente (GFP), lo que permite marcar las células y visualizar su desarrollo en el cultivo.

Producción y obtención del material genético para transfección

Se utilizó el vector pIRES2-AcGFP1, para transformar bacterias competentes de *E.coli* DH5α. Se tomó un tubo de células competentes almacenado -80°C, se le adicionó el plásmido y se incubó 30' en hielo. Luego, se sometieron a un shock térmico a 42°C durante 45'' y, una vez transcurrido el tiempo, se las colocaron rápidamente en hielo durante 2'.

Posteriormente, se procedió a recuperar las células, agregando 1 ml de medio LB (peptona de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10g/L) con 10 µl de glucosa 2M y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se prepararon placas de Petri con medio LB-agar, glucosa 2M y kanamicina 100 mg/ml. Una vez concluida la hora de recuperación, se centrifugaron las células 2' a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante dejando 100 ul de volúmen para resuspender el pellet. Finalmente, se plaquearon las células en las placas de Petri previamente preparadas y se incubaron en la estufa durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se seleccionaron colonias de bacterias transformadas al azar y se realizó un repique en 2ml de medio LB al que se le agregaron 2 µl de glucosa 2M y 2 µl de kanamicina 100mg/ml. Se dejó en agitación a 180 rpm a 37ºC durante la noche. A partir del cultivo, se llevó a cabo una miniprep usando el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* de Promega. Con el objetivo de comprobar el estado de el vector, este fue digerido con la enzima de restricción NcoI en Buffer H (Promega), y se incubó durante la noche a 4°C y luego durante 3 horas, a 37°C. Al día siguiente, se verificaron los fragmentos resultantes mediante gel de agarosa 1,5%.

Preparación del agente de transfección

Se pesan 100 mg de PEI y se disuelven en 100 ml de H2Od. La solución se lleva a pH 7 con HCl y posteriormente se esteriliza con filtro de tamaño de poro de 0,22 µm. La solución estéril se alícuota en tubos eppendorf por 50 µl y se almacena a -80°C hasta su utilización.

Expansión de células de mamíferos

Se descongela un vial de células almacenadas en nitrógeno líquido en un baño de agua a 37°C. Una vez descongeladas, se transfieren a un tubo Falcon y se agregan 10 ml de medio basal DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*: 4,5 g/l de D-Glucosa L-Glutamina; 110 mg/l de Piruvato de Sodio 0,11 g/L; Gibco). Luego, se centrifuga el tubo a 2600 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 5 ml de medio basal DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Finalmente, se trasladan las células a un frasco T25 y se incuban en una estufa a 37°C.

Transfección de células de mamíferos

Se realiza el desprendimiento enzimático con tripsina (Gibco) de células *wild type* de un cultivo en fase de crecimiento exponencial. Las células se resuspenden en un volumen final de 20 ml. La suspensión se diluye de manera tal de obtener una concentración de 1.10^5 y 2.10^5 células/ml. En una placa de 24 pozos (Greiner Bio-One) se coloca 1 ml/pocillo de esta suspensión. Pasadas las 24 horas, se preparan las soluciones para realizar la transfección:

Se preparan soluciones de manera tal que contengan 1µg de ADN y 1µg de PEI y se deja reposar 5 minutos a TA. Se mezclan y homogenizan las dos soluciones y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para el control negativo, se utilizará por separado la solución de PEI con medio basal y la solución de ADN con medio basal.
Por otro lado, se descarta el sobrenadante de las células *wild type* a transfectar y se lava con 1 ml de medio de cultivo basal para eliminar los restos de SFB que inhiben la transfección. A cada pozo se le agrega 200 µl de la mezcla lípido-plásmido correspondiente y se incuba durante 4 horas en estufa gaseada con CO_2 a 37 °C. Finalmente, a cada pozo se le agrega 800 µl de medio basal DMEM suplementado con 5% de SFB. La eficiencia de transfección se evaluará luego de las 24 y 48 horas por microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS

Obtención de vectores de expresión de GFP

Para verificar el estado del vector luego de la transformación y posterior miniprep, se realizó un corte con la enzima de restricción NcoI y se observaron los fragmentos mediante un gel de agarosa 1,5%. En la figura 1 se pueden observar fragmentos correspondientes a el vector pIRES2-AcGFP1.
En la calle 1, se tiene a el vector pIRES2-AcGFP1 cortado, la calle 2 se dejo vacía para mejor visualización y la calle 3 contiene a el marcador de peso molecular. Al cortar con la enzima se generaron cuatro fragmentos de aproximadamente 1900pb, 1800pb, 890pb y 700pb y pueden compararse con el marcador. Este marcador solo permite distinguir tamaños hasta 1000pb, por lo tanto, aquellos fragmentos de ADN que sean de mayor tamaño, se verán por encima de este patrón.
Se pueden distinguir tres bandas correspondientes al vector digerido, esto se debe a que los fragmentos de 1900pb y 1800pb, al tener un tamaño similar, no llegan a separarse en el gel.

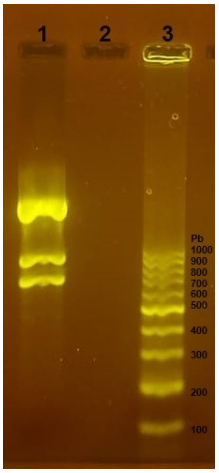

Figura 1: Gel de agarosa 1,5%

Transfección con lípidos catiónicos en línea celular CHO-K1

En primer lugar, se realizó un ensayo preliminar de transfección con el vector pIRES-AcGFP1 en células de la línea CHO-K1 para evaluar la eficiencia del proceso. Luego, se comprobó observando las células al microscopio, aquellas que se transfectaron exitosamente emiten luz verde (510 nm) bajo luz UV, característica de la proteína GFP. Se presentan gráficos de células CHO-K1 antes y después de la transfección con pIRES2-AcGFP1.

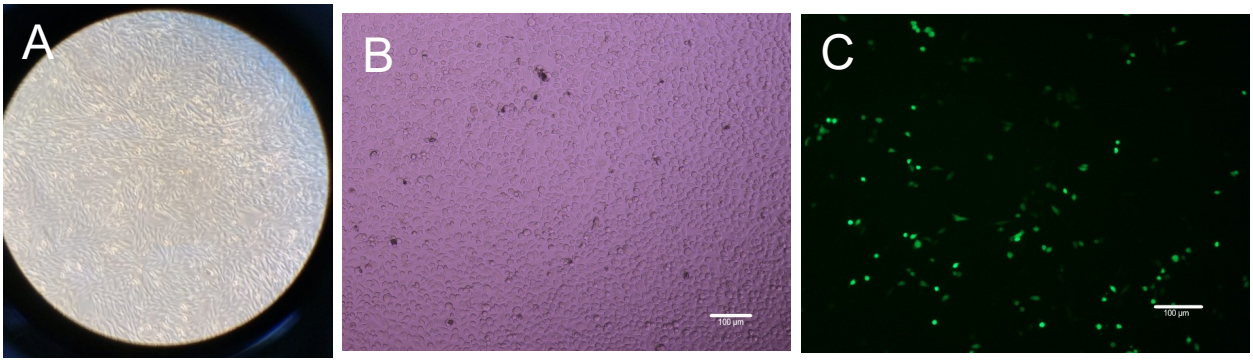

Figura 2: Células de la línea CHO-K1. *Imágenes de las células antes (A) y después de la transfección (B y C). Obtenidas con objetivo 10x*

Las células CHO-K1 se cultivaron en frascos T75 con medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), en estufa gaseada con 5% de CO_2 a 37°C, y luego se sembraron en placas de 24 pozos (Imagen A). En la imagen B, se observan las células mediante microscopía de campo claro luego de la transfección, se observa una densidad celular de $2x10^5$ células/ml, donde se agregó 1,5 µg de PEI por 1 µg de ADN. En la imagen C, se muestra la expresión de GFP en células transfectadas bajo luz UV, observadas con un microscopio invertido de fluorescencia.

Transfección con lípidos catiónicos en células Swan71

Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento con celulas Swan71. Estas se mantuvieron en frasco T75 con medio DMEM suplementado con 5% de SFB en estufa gaseada con CO_2 a 37ºC. Como se observa en la figura 3A, una vez que las células se adhieren al fondo del pozo, presentan una morfología característica de fibroblastos, con una estructura bipolar en la que la longitud es mayor que el ancho. En la imágen B, se observan las células mediante microscopía de campo claro luego de la transfección, en una densidad de 5.10^4 células/ml y 1.10^5 células/ml respectivamente, agregando 1,5 µg de PEI por 1 µg de ADN.. En la imágen C, se muestra la expresión de la proteína GFP en las células transfectadas. En este caso, se observa que las células pierden su morfología alargada característica, y forman aglomeraciones entre sí después de la transfección.

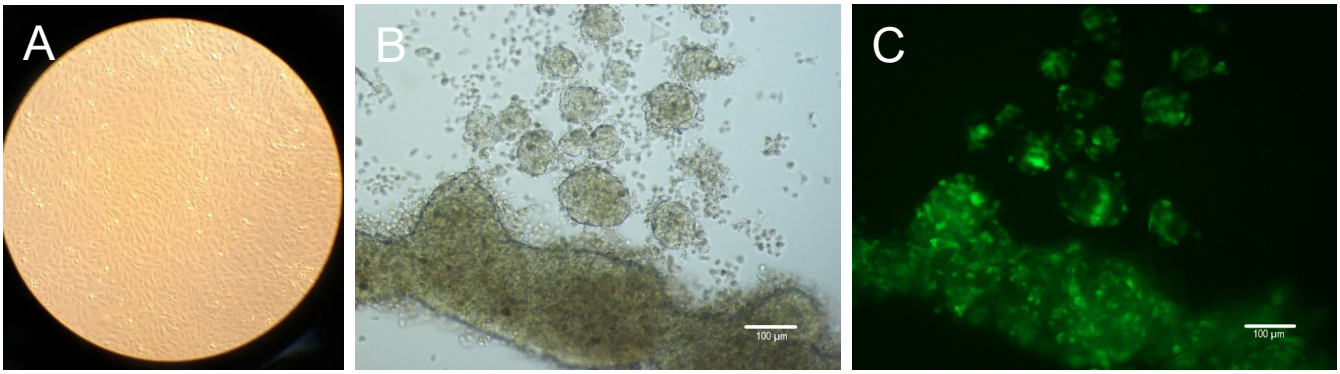

Figura 3: Células Swan71*. Imágenes de las células antes (A) y después de la transfección (B yC).Obtenidas con objetivo 10x.*

BIBLIOGRAFÍA

Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. 2013. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. Hypertension, 62(6):1046-54.

Whitley GS, Cartwright JE. 2010. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. Placenta, 31(6):465-74.

Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, Romero R, Mor G. 2009. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. Placenta, 30(11):939-48.

Abud JE, Pagotto R, Galliani V, Teglia C, Culzoni J, Bollati-Fogolín M, Zenclussen ML, Rodríguez HA. 2024. In vitro blastocyst implantation and trophoblast migration are disrupted by the UV filter benzophenone-3 (BP3). Environmental Pollution, 15;349:123840.

Wang H, Brown PC, Chow ECY, Ewart L, Ferguson SS, Fitzpatrick S, Freedman BS, Guo GL, Hedrich W, Heyward S, Hickman J, Isoherranen N, Li AP, Liu Q, Mumenthaler SM, Polli J, Proctor WR, Ribeiro A, Wang JY, Wange RL, Huang SM. 2021. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. Clinical Translational Science, 14(5):1659-1680.

Kimura H, Sakai Y, Fujii T. 2018. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. Drug Metabolism Pharmacokinetics; 33(1):43-48.