

Evaluación la producción de TNF alfa por PBMCs estimulados con LPS tratados con péptidos

Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio

Abstract

Evaluación de la capacidad de neutralización del efecto del Lipopolisacarido (LPS) de inducir la producción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF alfa) en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) tratadas con peptidos cationicos.

Citation: Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio Evaluación la producción de TNF alfa por PBMCs estimulados con LPS tratados con péptidos. **protocols.io**
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jb6c9e

Published: 20 Sep 2017

Guidelines

La capacidad de los peptidos para neutralizar o inhibir la producción de Lipopolisacarido (LPS) es medida a través de la capacidad de los mismos de inhibir la producción de TNF alfa en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs). El cultivo de PBMCs fue realizado con 250.000 células por pozo en un plato de cultivo de 96 pozos (Cellstar, greiner bio-one, cat-N°655180), las células fueron tratadas por triplicado con 10 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654), se utilizan controles por triplicado con medio de cultivo y los tratamientos con diferentes concentraciones del péptido a evaluar con LPS y sin LPS.

Se incuban las células por 12 horas (este tiempo se debe estandarizar) a 37 °C y 5 %CO₂; el sobrenadante es colectado y reemplazado con medio de cultivo celular con 44 µM de Rezaurin con el fin de evaluar la viabilidad celular. Posterior a esto los sobrenadantes colectados se les mide la producción de TNF alfa por ELISA (Human TNF-α ELISA MAX, BioLegend), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Before start

Preparar todos los reactivos y soluciones de trabajo con un día de anticipación.

Se recomienda realizar el ELISA de los sobrenadantes inmediatamente después de colectados; para esto se debe tener en cuenta que la placa debe sensibilizarse un día antes del desarrollo del ELISA.

Materials

- ✓ micropipettors; Sterile tips and serological pipettes by Contributed by users
- ✓ 96 well plates with lids FISHER SCIENTIFIC #087722C by Contributed by users
- ✓ 1.5 mL Eppendorf tubes by Contributed by users
- Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 [L2654](#) by [Sigma-aldrich](#)
- RPMI 1640 Medium [11875093](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)
- Antibiotic-Antimycotic (100X) [15240062](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

Protocol

Cultivo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs).

Step 1.

Cultivar en una caja de cultivo celular de 96 pozos 250.000cel/pozo a un volumen final de 100 µL/pozo en RPMI 1640 suplementado con antibiótico antimicótico (ampicilina/estreptomicina) 1X .

Dejar incubando por 12 horas, hasta que las células se estabilicen.



REAGENTS

- Antibiotic-Antimycotic (100X) [15240062](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)
- RPMI 1640 Medium [11875093](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)
- 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White [786-763](#) by [G-Biosciences](#)

Preparación de soluciones de trabajo

Step 2.

Realizar diluciones de proteína, péptido o compuesto a evaluar.

Calculando un volumen de 10 µL por pozo de la proteína/péptido a evaluar a una concentración 10X con respecto a la concentración final en el pozo.

Preparar la solución de trabajo de Lipopolisacarido (LPS) a 10X (100ng/mL).

Preparación de las alícuotas de LPS (según el inserto del LPS O26:B6).

1. Stock 1: tomar 1mg de LPS y re-suspenderlo en 1mL de Sln salina estéril (repartir en 10 tubos con alicuotas de 100µL). (Queda a una concentración de 1mg/mL)
2. Stock 2: tomar un tubo del stock 1 y sacar 1µL en un tubo nuevo y aforar hasta 1mL (repartir en 10 tubos con alicuotas de 100µL). (Queda a una concentración de 0,001mg/mL=1µg/mL)
3. Sln de trabajo 10X: A partir de un tubo del stock 2, tomar 1µL por pozo (100µL de volumen final) y lleve a 10µL para concentración de 100ng/mL o 10X.

Marque tubos de 1,5mL correspondientes a cada control y tratamiento.

Mezcle las soluciones de muestra, control y LPS en tubos de 1,5mL. ((10µL LPS 10X + 10µL tratamiento o control 10X +80µL medio de cultivo)/pozo)

Mezclar por vortex 1 min y dejar incubar los tratamientos a 37°C por 30 minutos.



REAGENTS

Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 [L2654](#) by [Sigma-aldrich](#)

- ✓ 1.5 mL Eppendorf tubes by Contributed by users

Adicionar los tratamientos a los PBMCs

Step 3.

Remueva el sobrenadante lentamente de cada uno de los pozos con PBMCs inclinando la placa 45° hacia usted.

Adicione 100 µL por pozo de cada uno de los tratamientos (mencionados en el paso 2) lentamente cambiando de punta.

Se recomienda adicionar de izquierda a derecha en el siguiente orden:

1. Medio de cultivo.
2. Muestras sin LPS.
3. Muestras con LPS.

	Medio de cultivo	Muestra	Muestra + LPS	LPS
--	------------------	---------	---------------	-----

		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
A												
B												
C												

El tiempo de incubación se debe estandarizar, sin embargo para realizar una primera evaluación recomendamos, dejar incubar por 12 horas a 37 °C 5 % de CO₂.

📌 NOTES

Lily Johanna Toro 06 Sep 2017

NO confundir los pozos que contienen LPS con los que no tienen, además no pase con la punta por encima de los pozos que ya tienen los tratamientos

Recolección de sobrenadantes

Step 4.

Prepare tubos de 1,5mL correspondientes a cada tratamiento.

Recoja los sobrenadantes por cada tubo.

Centrifuge a 9000g por 2 minutos, colecte los sobrenadantes y se recomienda realizar el ELISA para la detección de TNFalfa de forma inmediata, ya que hemos observado una disminución en las concentraciones de la citoquina en muestras despues de haber sido almacenadas a -30 °C.

Si va almacenar los sobrenadantes para medir las citoquinas posteriormente, hagalo a -80°C y evite la descongelación.

Con el fin de verificar la viabilidad de los PBMCs se recomienda adicionar Rezasurin (Indicador de metabolismo celular) a cada uno de los pozos 100µL/pozo a una concentración final de 44 uM, deje incubar la placa 2 hrs a 37 °C y 5 % CO₂ y posteriormente leer la placa por espectrofotometria a 570 y 450 nm. o por fluorescencia a ext/emisión: 579/584

Prepare solucion de trabajo con medio e cultivo a una concentracion final 1X (440 µM).



REAGENTS

Human TNF- α ELISA [430204](#) by [BioLegend](#)

resazurin [189900050](#) by [Acros Organics](#)



ANNOTATIONS

Germán Alberto Téllez Ramírez 19 Sep 2017

El protocolo del ELISA se debería iniciar con un día de anticipación para sensibilizar la placa.

Análisis de los resultados

Step 5.

Se obtendrán dos lecturas por pozo de 570 y 450 nm.

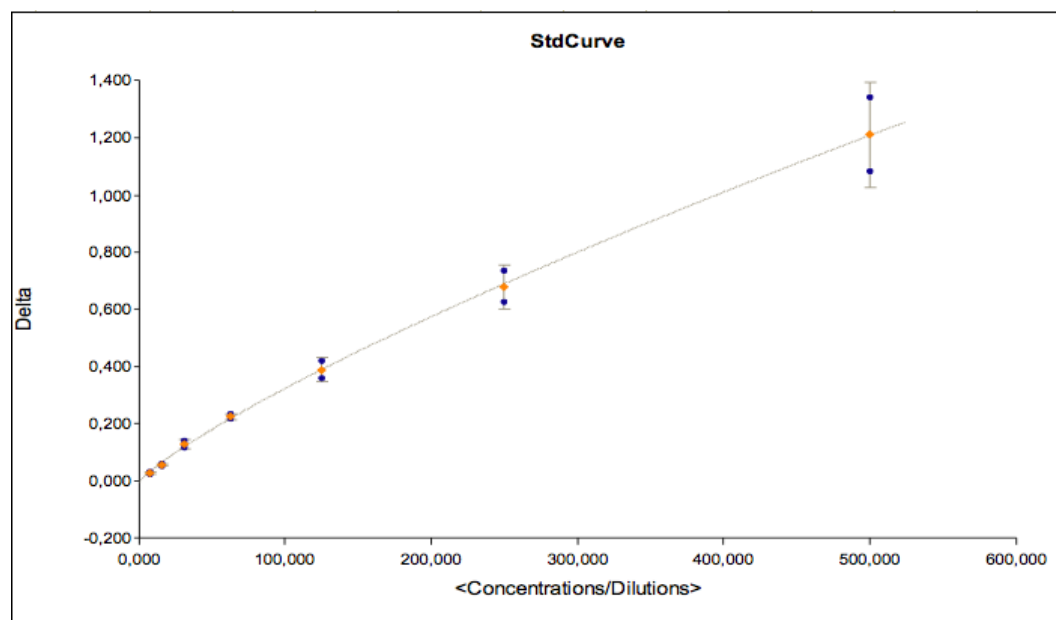
Como blanco se tomarán los pozos en los cuales hemos adicionado únicamente células y medio de cultivo celular (blanco).

Al blanco calcularle la mediana, y restarla a todos los pozos.

Posteriormente, calcular el delta a cada uno de los pozos (450-570nm).

Calcular la curva estandar de la curva de TNF α que viene en el kit, donde relacione en el eje X: concentraciones y en el eje Y: delta.

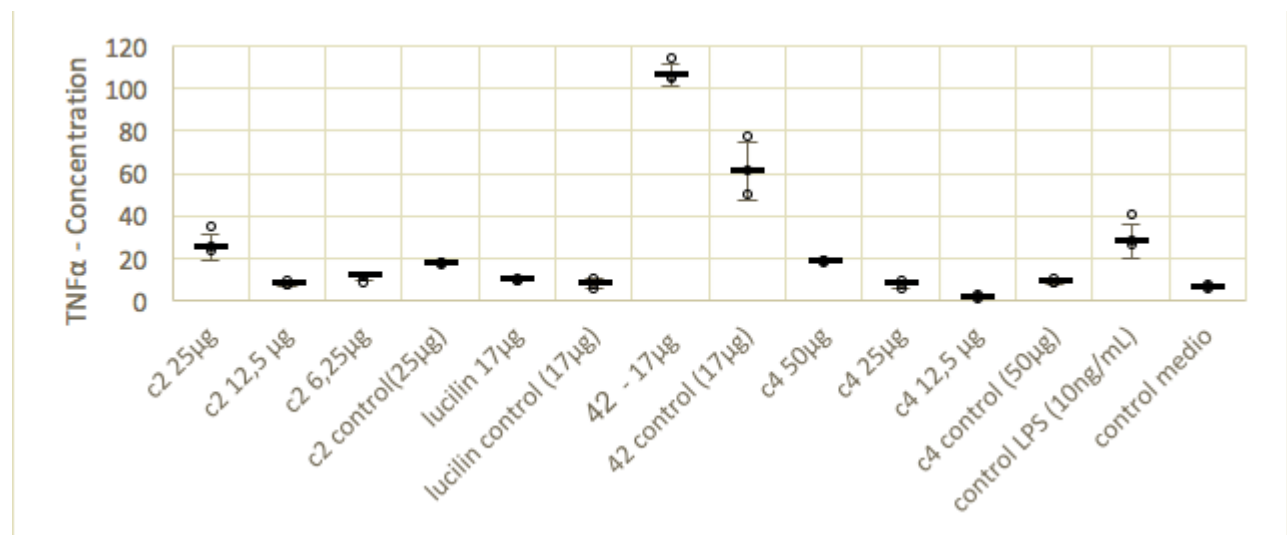
Así:



Con la formula de la curva aplicar para cada uno de los tratamientos evaluados.

$$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$$

Finalmente graficar Tratamientos Vs Concentraciones de TNF alfa (pg/mL) obtenidas.



Warnings

Se debe tener mucho cuidado en el momento de hacer la extracción de PBMCs en cuanto a la manipulación de la sangre de un individuo sano (ver protocolo).