

Trabajos Prácticos Dirigidos

Parte de este documento está tomado de Romero *et al.* “Métodos alternativos a la experimentación animal (Guía de prácticas)”. Ed. Diego Marín, Murcia (2005). ISBN: 84-8425-409-7

Profesorado:

Dr. Diego Romero García

Dra. Emma Martínez López

Dr. Antonio Juan García Fernández

Ldo. Alejandro Hernández García

**(Grupo de Investigación E008-12 Toxicología,
Universidad de Murcia, España)**

Sesión 1. Descongelación de líneas celulares y estudio preliminar del cultivo.

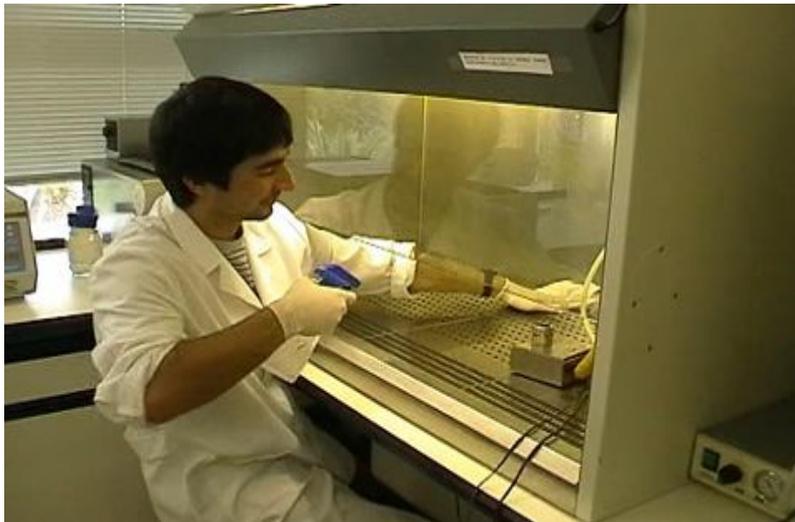
El objetivo de esta práctica es la descongelación de un microtubo con células de una línea celular. Este material será evaluado en términos de viabilidad y sembrado en un frasco de cultivo, el cual proporcionará material para sesiones posteriores. Igualmente se preparará el material necesario para que en la sesión siguiente, se pueda comprobar la ausencia de micoplasmas en las células del cultivo.

Para la realización de las prácticas comprendidas en esta asignatura contamos con diverso material biológico adquirido de colecciones acreditadas a nivel internacional (ATCC y ECACC). Para esta sesión se elegirá un cultivo en monocapa.

El alumno/a deberá anotar toda la información en su cuaderno/guía de prácticas.

El medio de cultivo a utilizar será el recomendado por el laboratorio de procedencia, o según la información procedente de experiencias previas. En cualquier caso, siempre utilizaremos de forma preventiva una combinación de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Antes de iniciar cualquier operación se acondicionará el puesto de trabajo (cabina de seguridad biológica) mediante limpieza con alcohol 70% y flujo continuo de aire durante al menos 10 minutos.

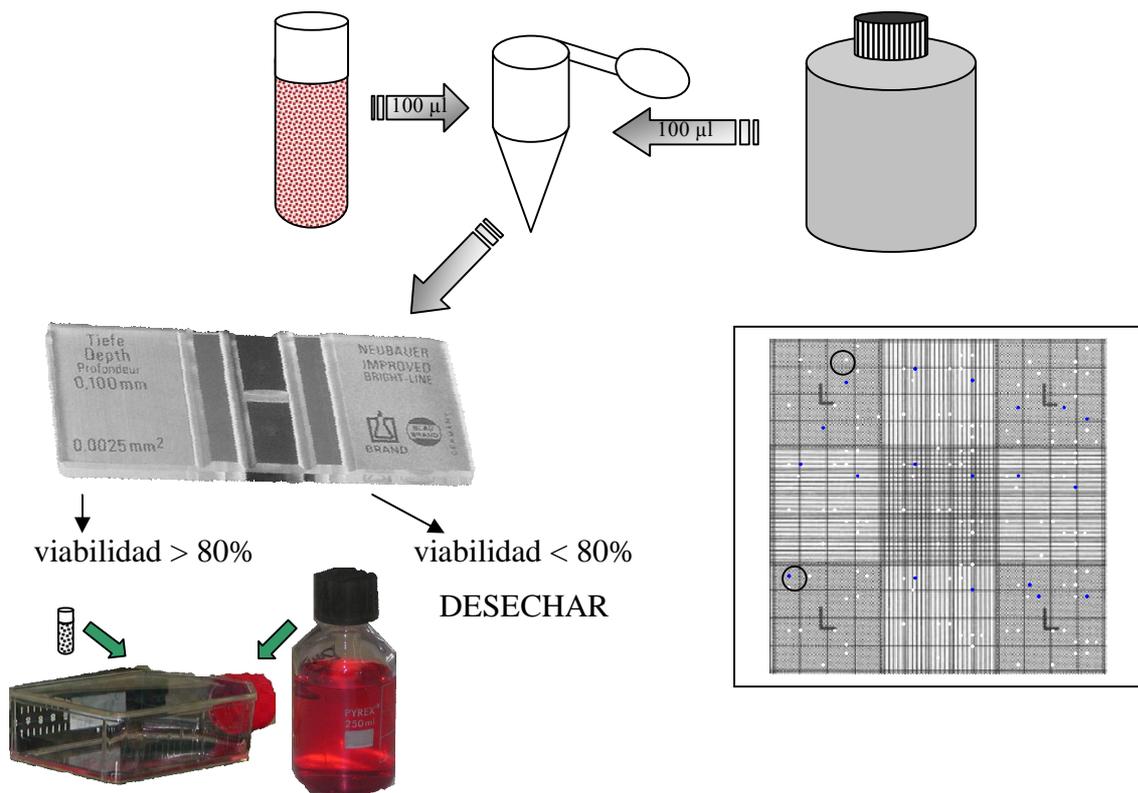


Descongelación de criotubos. La manipulación del material mientras que éste se encuentre en nitrógeno líquido correrá a cargo EXCLUSIVAMENTE del profesor de la asignatura.

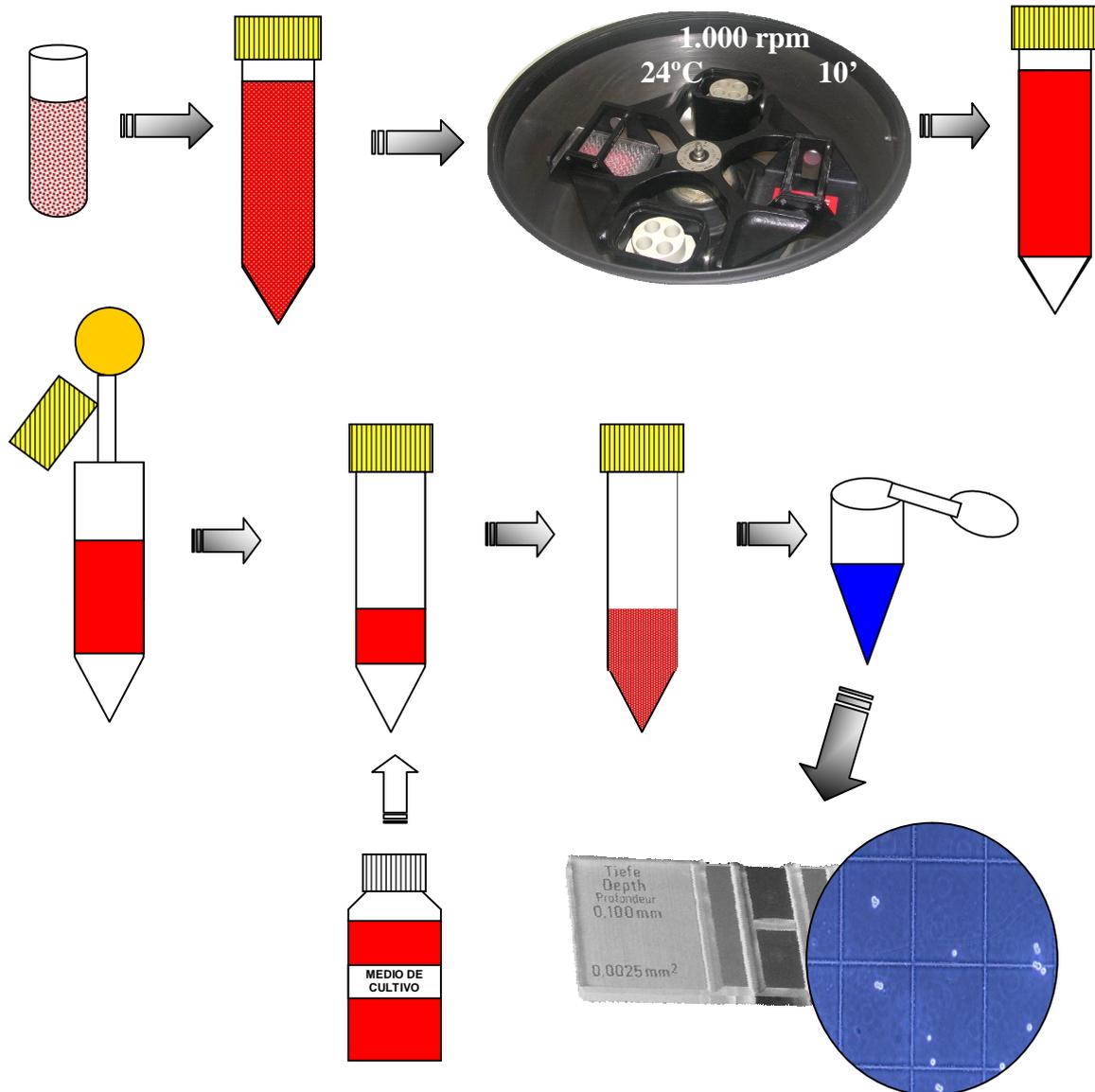


Una vez que los criotubos estén fuera del depósito de nitrógeno líquido serán transportados de forma inmediata a un baño térmico a +37°C, procurando que la parte superior no quede sumergida en el mismo. Cuando su contenido se encuentre en estado líquido (3-4 minutos), se procesará en la cabina de flujo siguiendo una de las dos pautas siguientes.

Alternativa 1. Tomar una alícuota (100 µl) y llevarla a un microtubo, adicionando otros 100 µl de azul tripan. Homogeneizar la mezcla y comprobar el porcentaje de células vivas en cámara de recuento (hemocitómetro). Si el porcentaje de células vivas es superior al 80 %, con una pipeta Pasteur recogeremos todo el contenido del criotubo y lo llevaremos a un frasco de cultivo de 25 cm². Para terminar se añadirá 5 ml de medio de cultivo.



Alternativa 2: tomar con pipeta Pasteur todo el contenido del criotubo e introducirlo en tubo de centrifuga, enrasando en 15 ml con medio de cultivo fresco. Centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante mediante pipeta Pasteur. Resuspender el sedimento en 2 ml de medio de cultivo fresco. Tomar una alícuota (100 μ l) y llevarla a un microtubo, adicionando otros 100 μ l de azul tripan. Homogeneizar la mezcla y comprobar el porcentaje de células vivas en cámara hemocitométrica. Si el porcentaje de células vivas es superior al 80%, con una pipeta Pasteur se recogerá toda la suspensión celular y se procederá igual a lo indicado en el caso anterior.



Una vez que las células estén en el frasco de cultivo, se comprobará el resultado de la siembra mediante observación en un microscopio de contraste de fase.

En el caso de haber optado por la primera alternativa, se procederá al cambio de medio de cultivo una vez transcurridas 24 horas tras la siembra. En el segundo caso, el primer cambio de medio se realizará a las 48 horas tras la siembra.

Estudio de viabilidad celular: azul tripán y citometría de flujo.

1.- Tinción con azul tripán. Se realizará cuando se realice descongelación de criotubos y también en el subcultivo (sesión 5). La viabilidad se estudiará mediante la tinción de las células muertas con el colorante azul tripán. Se contará el número de células vivas y muertas en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer, calculándose la media y los porcentajes correspondientes.

$$N = n \cdot v \cdot fd \quad \text{siendo}$$

N = número total de células por ml

n = número de células por cuadrante (media aritmética de los cuatro cuadrantes)

v = conversión del volumen de la cámara a ml

fd = factor de dilución de la muestra en el colorante (azul tripán)

NOTA: las medidas de cada cuadrante de la cámara de Neubauer son 1 mm de lado y 0,1 mm de altura.

2.- Viabilidad celular por citometría de flujo. El número de células que vamos a necesitar para realizar correctamente este estudio de viabilidad será de al menos 10^6 células. Dichas células serán introducidas en un tubo de citometría, en un volumen final de 1 ml de tampón fosfato (PBS). A esta mezcla se le adicionará 10 μ l de yoduro de propidio a una concentración de 400 μ g/ml, ($C_{27}H_{34}N_4I_2$), dejándose en oscuridad y temperatura ambiente durante 15-20 minutos. El yoduro de propidio es el fluorocromo utilizado para teñir la muestra. Es el más usado pues se une a los ácidos nucleicos de doble cadena y emite fluorescencia rojo-anaranjada. Este colorante SÓLO SE MANIPULARÁ EN CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA, y los materiales con los que contacte serán eliminados al contenedor específico para este reactivo (contenedor rojo del laboratorio de citometría). El software del equipo proporciona el porcentaje de células marcadas con el fluorocromo (muertas).

Preparación de placas para estudio de ausencia de micoplasmas. El citoplasma de las células debe quedar bien extendido para ser visualizado al máximo. Para ello tomaremos una muestra de aproximadamente 5.000 células y las sembraremos en una placa de petri de 2.5 cm de diámetro con medio de cultivo suplementado con SFB. Ésta se llevará a incubación a +37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂, dejando que las células crezcan durante aproximadamente 24-48 horas. La tinción selectiva de ADN, base de esta técnica, se realizará en la sesión 2.

Crioconservación. Para la conservación de células el procedimiento a seguir será el mismo que el descrito para el subcultivo, con la salvedad de que los frascos serán utilizados cuando el cultivo se encuentre en fase exponencial de crecimiento (antes de alcanzar la confluencia). Una vez tripsinizadas, centrifugadas y conocido el número total de células, el volumen final se ajustará a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml, y se distribuirá en criotubos en un volumen final de 1.8 ml en el que se incluirá el 10% (v/v) de DMSO como agente crioprotector. A partir de aquí se pasarán

los tubos a un depósito con propilenglicol y posteriormente los introducirán en un congelador a -80°C . Una vez alcanzada esta temperatura, los microtubos serán finalmente almacenados en nitrógeno líquido (-196°C).

Descongelación

Línea celular.....

Células viables (% y técnica utilizada).....

Preparación de cultivo para estudio de ausencia de micoplasma

Línea celular.....

Número de células sembradas.....

Dibuje y describa la imagen de la siembra inmediatamente después de la misma:

