

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

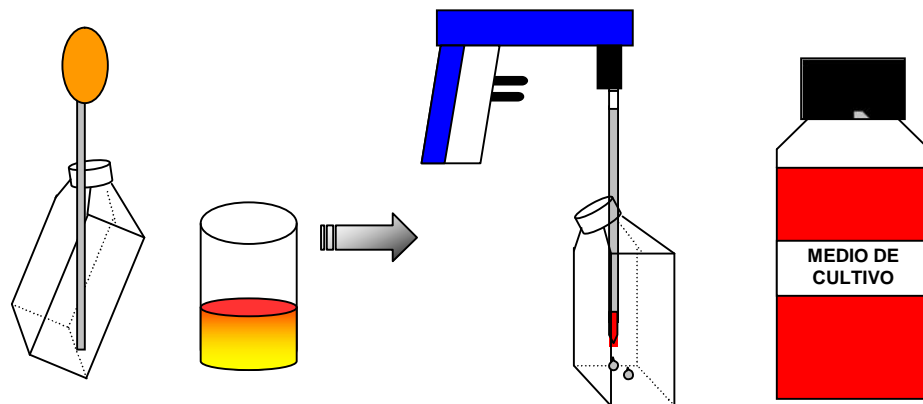
**(Grupo de Investigación E008-12 Toxicología,
Universidad de Murcia, España)**

Sesión 2. Mantenimiento *in vitro* de los cultivos. Operaciones básicas

El objetivo de esta práctica es la de realizar el mantenimiento periódico de un cultivo en monocapa, mediante el correspondiente cambio de medio de cultivo, y estudio microscópico del mismo una vez transcurridas unas horas desde la descongelación. Igualmente se estudiará la ausencia o presencia de micoplasmas mediante microscopía de fluorescencia.

Material adicional: videos.

Cambios de medio de cultivo. Esta operación se efectuará a las 24-48 horas tras la descongelación y siembra, y cada 48 horas siempre y cuando el cultivo esté en un estado de confluencia inferior al 90-95%. Siempre se llevará a cabo en el interior de la cabina de seguridad biológica. Para realizar esta operación de forma correcta, se pipeteará todo el medio de cultivo contenido en el frasco de crecimiento y se eliminará en un depósito para desechos biológicos al que previamente le añadiremos aproximadamente 100 ml de lejía de uso doméstico. No se mantendrá el cultivo sin medio más tiempo que el estrictamente necesario para completar esta operación. Inmediatamente añadiremos 5 ml de medio de cultivo fresco y agitaremos suavemente el frasco para distribuir bien dicho medio.

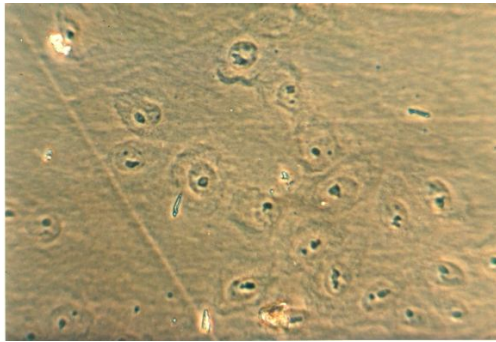


Estudio del cultivo mediante microscopía óptica. Antes y después de efectuar el cambio de medio de cultivo se realizará una inspección visual a diferentes aumentos (10x, 20x, 40x) con el microscopio óptico, digitalizando las imágenes visualizadas. Se estudiará el estado de confluencia, aspecto morfológico, posible contaminación bacteriana y/o fúngica, presencia de células muertas, etc.

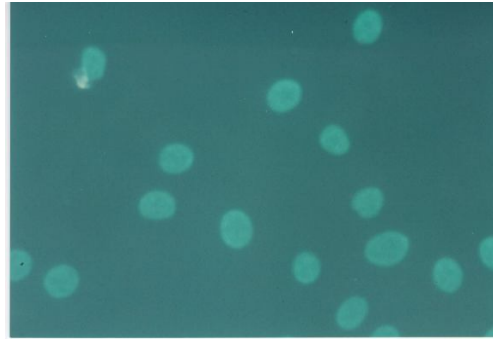
Estudio de ausencia de contaminación por micoplasma. Al cultivo preparado para este fin en la Sesión 1 se le aplicará el siguiente protocolo para tinción del ADN:

- Retirada del medio de cultivo sin dejar las células completamente secas.
- Las células se fijarán durante 5 minutos con 3-4 ml de fijador de Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1).
- Retirada del fijador y adición de nuevo de otros 3-4 ml de fijador dejándolo actuar durante 10 minutos.
- Retirada del fijador, dejando la placa secar al aire.

- Adición de 3-5 ml de solución colorante específico para ADN (*H33233*, *Hoechst*), e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Retirada de la solución colorante y lavado de las células tres veces con agua bidestilada.
- Estudio de la preparación con un microscopio de fluorescencia a 40x. La ausencia de micoplasmas se comprueba por la no presencia de citoplasma celular teñido.



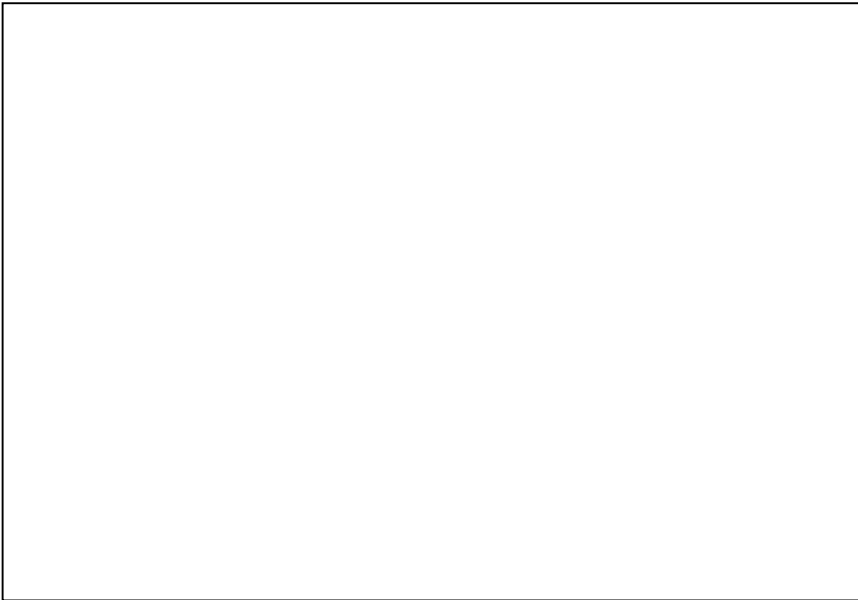
*Microscopía óptica de
contraste de fase*



*Microscopía de fluorescencia.
Ausencia de micoplasmas*

Cambios de medio de cultivo

Describe y dibuje el aspecto del cultivo



Estudio de contaminación por micoplasma

Dibuje y comente la ausencia o presencia de micoplasmas en el cultivo, razonando el resultado de la técnica

