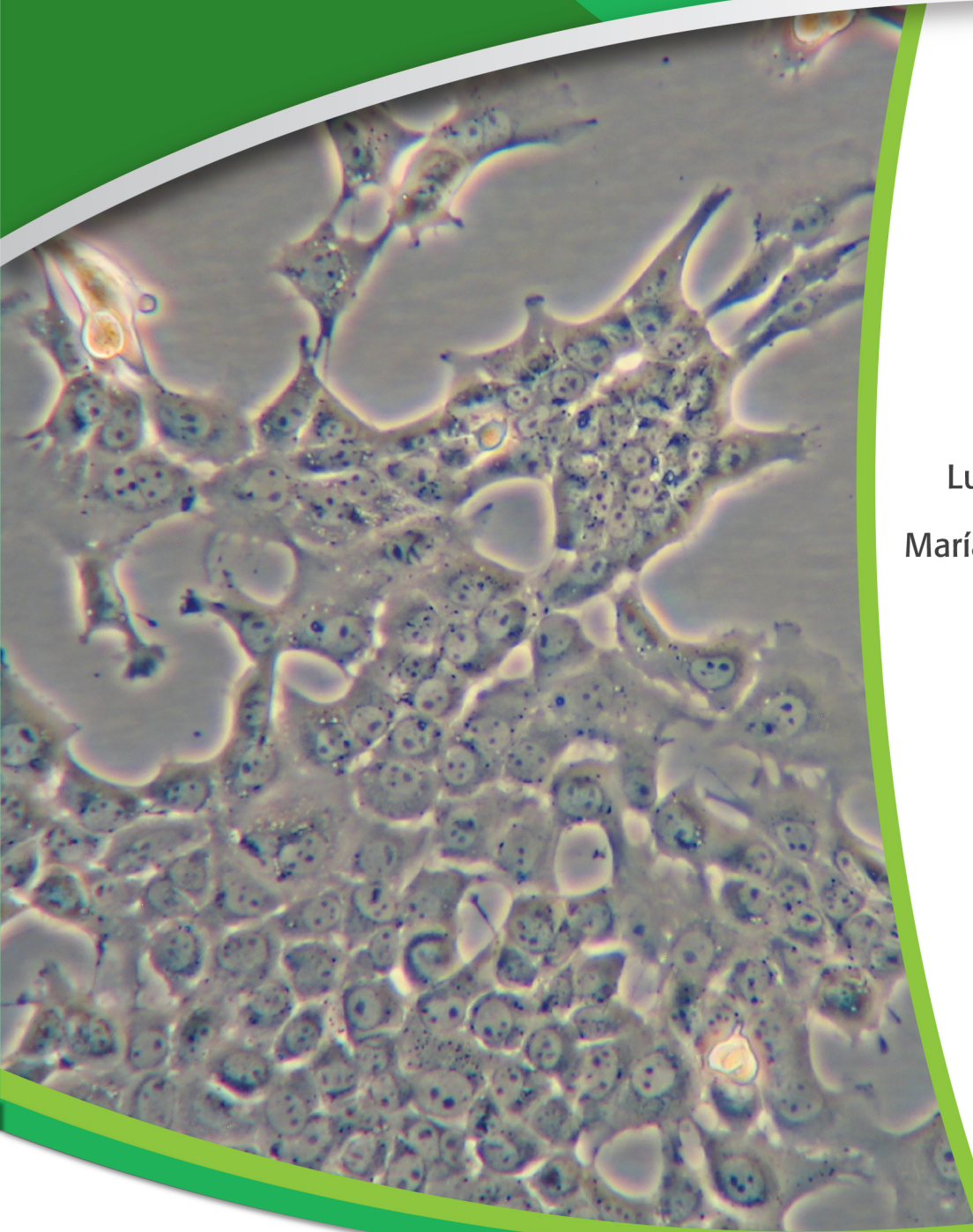




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Cultivo de Células Animales



Leticia **Bucio Ortiz**

Verónica **Souza Arroyo**

Luis Enrique **Gómez Quiroz**

María Concepción **Gutiérrez Ruiz**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Imagen de portada: Células AML12. Hepatocitos de hígado normal,
de ratón. 100X. Tomada por Leticia Bucio Ortiz

Primera Impresión 2015
ISBN: 978-607-28-0677-1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Introducción	5
Medidas de seguridad en el laboratorio	7
Práctica 1 Material de laboratorio de cultivo y prueba de esterilidad	9
Práctica 2 Descongelación y cultivo de células.	15
Práctica 3 Cosecha, resiembra y conteo de células cultivadas y evaluación de la viabilidad.	21
Práctica 4 Prueba de funcionalidad mitocondrial.	27
Práctica 5 Prueba de funcionalidad lisosomal.	31
Práctica 6 Lisis de células cultivadas y cuantificación de proteína (método BCA)... ..	35
Práctica 7 Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica y obtención de cromosomas..	41
Práctica 8 Congelamiento de líneas celulares.	47
Práctica 9 Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de ratón..	51

Introducción

El primer registro que se tiene sobre el cultivo de células animales en condiciones *in vitro* es de 1907, cuando Harrison cultivó fibras nerviosas de embriones de rana. A partir de entonces, a lo largo del siglo XX y hasta el presente, esta técnica se ha ido modificando, perfeccionando y adecuando a un amplio número de tipos celulares: normales, tumorales, de diversos órganos y tejidos, así como de organismos vertebrados e invertebrados y se ha utilizado en innumerables investigaciones científicas. El PubMed de la NCBI (National Center for Biotechnology Information), tiene un registro de más de 300 000 trabajos de investigación relacionados al cultivo celular.

En el presente manual, se muestran las técnicas básicas sobre el cultivo de células animales de manera general, hasta la obtención de un tipo celular específico, que pretenden iniciar al alumno en el conocimiento de esta herramienta, muy útil en la preparación del profesionista de las ciencias médicas. Por otra parte, responde a las necesidades de llevar a la práctica los temas considerados en la UEA: Cultivo de células animales, clave 2342026 la cual comprende 3 h de teoría y 4 h de laboratorio por semana. Dicha UEA es de tipo optativo para las licenciaturas de Biología Experimental, Biología, Hidrobiología, Producción Animal, así como para las Ingenierías de Bioquímica Industrial y de Alimentos y ha sido aprobada por el Colegio Académico de la UAM, en su sesión 344 del 13 de Abril del 2012. Las prácticas indicadas responden en un 99% al contenido del programa.

Su contribución al mejoramiento de la docencia es primordial, ya que permitirá el aprendizaje de habilidades en el manejo de varias técnicas de laboratorio, así como una capacitación por parte del alumno. Éste podrá desempeñar en la realización de proyectos de investigación para explicar aspectos como mecanismos moleculares involucrados en la proliferación o la producción de vacunas, hasta su aplicación en estudios de tipo: genético, toxicológico, farmacológico, terapéutico, etcétera.

Por tratarse de una UEA formulada por investigadores en el tema y aprobada en las modificaciones a la licenciatura en Biología Experimental 2012 y aplicada recientemente (enero de 2013) el contenido del programa presenta actualidad y calidad.

Medidas de seguridad en el laboratorio

A continuación se indican las medidas de seguridad a seguir en el laboratorio para la realización del cultivo celular:

- Es obligatorio el uso de bata limpia y cubrebocas.
- Lavarse siempre las manos antes y después de realizar la práctica.
- Al momento de realizar el cultivo celular es conveniente limpiarse las manos con un poco de alcohol al 70 %.
- Queda prohibido fumar e ingerir alimentos y bebidas dentro del laboratorio.
- Queda prohibida la visita de personas ajenas a la práctica que se realiza.
- Al realizar cada una de las prácticas, se debe estar informado de las medidas de seguridad, así como del manejo y toxicidad de los reactivos empleados.
- Debido a que se trabaja con material biológico (células, tejidos, sangre, etc.) es importante realizar los procedimientos como se indica en las prácticas, cuidando de no tener contacto directo con los reactivos químicos y las muestras biológicas.
- Al terminar la práctica, depositar los desechos químicos y biológicos en contenedores especiales, debidamente etiquetados. En el caso de medios de cultivo ya utilizados, éstos deberán ser desactivados y las muestras biológicas deberán ser incineradas.
- Debido a que la mayor parte de material empleado debe ser esterilizado, tener cuidado con el manejo del autoclave.
- Identificar en el lugar, la localización de los extinguidores, las regaderas y las salidas de emergencia del laboratorio, en caso de una emergencia.
- En caso de tener que evacuar el laboratorio, cerrar la llave del gas y salir de forma ordenada siguiendo en todo momento las instrucciones que haya impartido el profesor.

Práctica 1

Material de laboratorio de cultivo celular y prueba de esterilidad

Introducción

El cultivo celular es un procedimiento o técnica que consiste en la proliferación controlada de un tipo celular, a partir de unas pocas células en condiciones controladas de: temperatura, nutrientes, pH, humedad, y presiones de gases como CO₂ y O₂. Usualmente se implementa con la finalidad de realizar en las células, experimentos controlados que permitan conocer, de manera específica, la respuesta de un tipo celular homogéneo ante estímulos controlados y definidos, administrados por el investigador.

Lo anterior es particularmente útil en estudios toxicológicos y bioquímicos, donde el interés es conocer la respuesta de un tipo celular que conforma un tejido. Por ejemplo, en el caso del hígado es bien sabido que el órgano está compuesto por varios tipos celulares los cuales participan de manera diversa en la respuesta del órgano hacia los estímulos que le llegan. El realizar estudios en hepatocitos en cultivo, permite conocer la respuesta celular de manera particular sin la intervención de los demás tipos celulares, como son las células de Kupffer o las estelares, por citar solo unos ejemplos.

Se trata de una técnica de gran importancia ya que en la actualidad se realizan cultivos *in vitro* de diferentes tipos celulares, tejidos y órganos, normales o tumorales, así como de diferentes especies de tipo animal, vegetal o de vertebrados e invertebrados. Dichos cultivos se emplean en investigación científica para realizar diversos estudios relacionados con: inmunología, farmacología, toxicología, genómica, actividad intracelular, flujo de sustancias intracelulares, interacciones entre célula- célula, obtención de productos celulares, e ingeniería de tejidos.

En la realización del cultivo celular adecuado se debe considerar la asepsia, tomando en cuenta que el material así como el ambiente sea estéril, ya que la tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior al de los contaminantes habituales como son: hongos, levaduras, bacterias y micoplasma.

Existen diversos métodos para esterilizar los materiales y soluciones empleadas para el cultivo, éstos pueden ser por: calor seco, calor húmedo, irradiación, métodos químicos, o filtración.

También es importante que la persona conozca algunas generalidades del laboratorio de cultivo, el material y el equipo que se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Requerimientos para el cultivo celular

Básicos	Benéficos (no esenciales)	Complementarios
Campana de flujo laminar	Contador de células	Máquina lavadora de equipo de vidrio
Incubadora de CO ₂	Bomba de vacío	Medidor de conductividad
Tanques de CO ₂	Pipeteador automático	Osmómetro
Autoclave	Potenciómetro	Centrifuga de alta capacidad
Refrigerador	Horno para esterilizar	Contador de colonias
Congelador (-20°C)	Termómetros	Microscopio confocal
Microscopio invertido	Microscopio de contraste de fases	Cámara digital y monitor para microscopio invertido
Equipo de filtración o filtros desechables	Microscopio de fluorescencia	Equipo de video con time-lapse
Centrifuga clínica	Dispensadores automáticos	Esterilizador de plásticos
Tanque o Termo con nitrógeno líquido	Carros con ruedas	FACS
Agua ultrapura des-ionizada y estéril	Hornos de secado	
Parrillas de agitación	Ultracongelador (-80 °C)	
Hemocitómetro o cámara de Neubauer		
Baño María		

Material de vidrio: vasos de precipitados, matraces, pipetas, de diferente capacidad, etcétera.

Material de plástico para cultivo: cajas Petri, botellas de cultivo, tubos cónicos para centrifuga, de diferente capacidad, etcétera.

Objetivos

- Conocer el material y equipo primordial para realizar cultivo celular.
- Hacer pruebas de esterilidad de medios y soluciones empleadas en el cultivo celular.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe ser esterilizado previamente.

- 5 Viales de 15-20 mL.
- 6 Pipetas serológicas de 10 mL.
- 1 Mechero.
- 1 Incubadora.
- 1 Pipeteador automático o perilla.

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Nutrient Broth no. 3 Vegitone (Sigma).
- Etanol (J.T. Baker).

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05% de tripsina y 0.02 de EDTA en solución amortiguadora.
- Medio nutritivo enriquecido. Nutrient Broth no. 3. Preparar según indicaciones y esterilizar en autoclave.
- Etanol al 70 %.

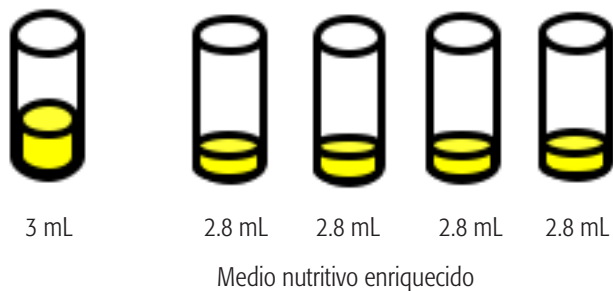
Procedimiento

A. Conocimiento del laboratorio de cultivo celular

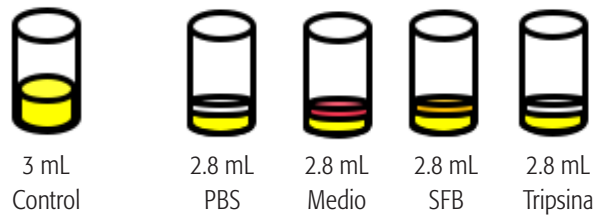
Hacer un reconocimiento del laboratorio de cultivo celular, enumerando los equipos y material empleado en esta técnica, así como su función.

B. Prueba de esterilidad

1. En la campana de flujo laminar, se colocan los frascos que contienen las soluciones a las que se desea realizar la prueba de esterilidad, como son: el PBS, el medio de cultivo, el SFB, la tripsina, etc. así como el medio nutritivo enriquecido. Los frascos deben estar a temperatura ambiente y limpiarse con Etanol antes de introducirse a la campana.
2. Para cada solución o medio se debe emplear una pipeta específicamente. Al utilizar cada pipeta o abrir y cerrar cada frasco se debe flamear con la llama del mechero, las campanas de flujo laminar de seguridad tipo II o III, no requieren el uso de mechero.
3. Etiquetar los viales según corresponda a cada solución o medio así como a un control.
4. Colocar 3 mL de medio nutritivo enriquecido al vial que dice control y 2.8 mL a cada uno de los viales de la prueba de esterilidad.



5. Colocar a su vial correspondiente: 0.2 mL de solución de PBS, o 0.2 mL de Medio de cultivo, o 0.2 mL de SFB o 0.2 mL de solución de tripsina.



6. Cerrar los viales sin olvidar flamear la boca del frasco y la tapa. Incubar por 48 h mínimo, para realizar la observación de esterilidad de cada solución.

Resultados

Realice un listado de todos los equipos y materiales empleados en el cultivo celular con que cuenta el laboratorio, así como su función, como se indica en la tabla.

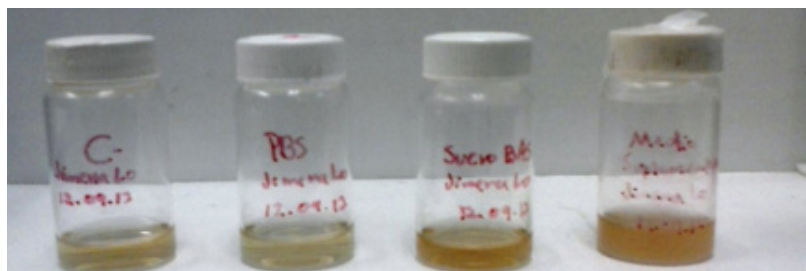
Equipo	Función

Material	Función

Continuar el número de filas necesarias.

Indica las observaciones de cada uno de los viales donde se realizó la prueba de esterilidad.

Viales a las 72h de incubación.



Transparentes.

Contaminado



Análisis de Resultados

Conclusión


Cuestionario

1. Defina los siguientes términos:
 - a. Cultivo celular.
 - b. Medio de cultivo.
 - c. Solución amortiguadora o buffer.
 - d. Condiciones de esterilidad.
 - e. Flujo laminar.
2. En sus propias palabras, responder:
 - a. ¿Cuáles son los principales requerimientos para realizar un cultivo celular?
 - b. ¿En qué consiste la prueba de esterilidad y cuál es su importancia?
3. ¿Qué tipo de contaminación se puede dar en los cultivos celulares?
4. Investigar y describir brevemente los tipos de campanas de cultivo y las incubadoras que existen y pueden ser empleadas en el cultivo de células animales.

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.

Referencia electrónica

-  Cultek. Sección Técnica de Células Madre. Recuperado de: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/celulas%20madre/celulas_madre_tecnicas.pdf (Se ingresó el 5 de marzo del 2015).

Práctica 2

Descongelación y cultivo de líneas celulares

Introducción

El cultivo primario se refiere al cultivo de células producidas de la disgregación de un tejido, ya sea por efectos mecánicos o enzimáticos. Aunque suele ser difícil y complejo el proliferar células mediante ésta técnica (excepto para fibroblastos), con varios ensayos de prueba y error se puede encontrar las condiciones ideales para realizar varios subcultivos y originar una línea celular transformada.

Una vez que las células cultivadas han proliferado y alcanzan la confluencia celular (formando una monocapa) pueden ser subcultivadas, mediante tratamiento con tripsina para separar las células entre sí, formar alícuotas de homogenado celular y resembrarlas en un área mayor, de 1:2, o hasta 1:4 para continuar el cultivo.

Las células subcultivadas durante varios pasajes pueden llegar a mantener ciertas características estables de tipo morfológico, bioquímico y genético, cuando esto ocurre se les considera una línea celular.

Las líneas celulares pueden ser adquiridas comercialmente y se venden en tubos criogénicos, a partir de las cuales se inicia y establece la proliferación celular.

Estas líneas celulares las hay de diferentes tipos celulares normales o tumorales, de diversos órganos y especies, según los requerimientos del investigador, pero todas ellas tienen en común que son células inmortalizadas, ya sea de manera natural como en las de origen canceroso, o por medios moleculares introduciendo deliberadamente oncogenes o virus que generan la sobreactivación estable y permanente, de proteínas relacionadas con la proliferación celular.

La criopreservación celular involucra mantener a las células en un medio el cual contiene un criopreservador como dimetil-sulfóxido (DMSO) o glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual disminuye las funciones vitales de las células y las mantiene en condiciones de vida suspendida por tiempos prolongados.

Al ser requeridas las células congeladas, éstas son centrifugadas para desechar el medio en el que han estado suspendidas y se colocan en condiciones adecuadas de medio de cultivo fresco, con nutrientes, temperatura y humedad específicas, para ser cultivadas y proliferar activamente. Al cabo de unos días, esto nos llevará a contar con una población celular suficiente, para realizar diversos estudios en investigación e incluso, al tener una buena cantidad celular poder nuevamente congelar células para su almacenamiento y disponibilidad.

Objetivos

- Aprender y manejar la técnica de descongelamiento de líneas celulares criopresevadas en nitrógeno líquido.
- Aprender y realizar el cultivo de una línea celular.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe ser esterilizado previamente.

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
 - 1 Tubo cónico para centrifuga de 15 mL.
 - 1 Mechero.
 - 1 Pipeteador automático o perilla.
 - 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
 - 1 Piceta con Etanol al 70%.
 - 1 Botella de cultivo de 75 cm² o una caja Petri.
 - 1 Campana de flujo laminar.
 - 1 Incubadora de CO₂ con chaqueta de agua.
 - 1 Baño María (BM).
 - 1 Microscopio invertido.
 - 1 Cámara fotográfica adaptable al microscopio.
 - 1 Centrifuga.
- Células: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 o cualquier otro de tipo epitelial que se tenga (MCF7, MCF10, Huh7, etc).

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Etanol (J.T. Baker).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05% de tripsina y 0.02 % de EDTA en solución amortiguadora.
- Solución de antibiótico-antimicótico se vende comercialmente, contiene penicilina, estreptomina, anfotericina y fungizona.
- Etanol al 70 %.

Procedimiento

A. Preparación de medio de cultivo suplementado.

- A una botella de medio con 500 mL, agregar Suero Fetal de Bovino (o el requerido) para tener una concentración entre el 8-10%. Recuerde que previamente realizó a cada solución su prueba de esterilidad.
- Agregar solución de antibiótico al medio de cultivo, a una concentración final del 1%. Etiquetar con nombre del medio, fecha de realización, persona responsable del medio.
- En caso de que el medio se haya preparado con anterioridad y se haya almacenado en refrigerador, colocar en baño María a 30-37°C, para que tenga una temperatura adecuada.

B. Descongelamiento de células.

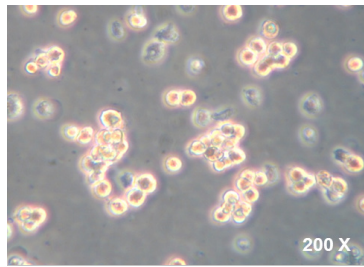
1. Limpiar los frascos de soluciones con Etanol al 70% y colocarlos dentro de la campana, así como el material limpio y estéril (frascos, vasos, etc.) que se vaya a utilizar.
2. Obtener el criotubo con las células del nitrógeno líquido, tener cuidado de no sufrir un accidente con el nitrógeno ya que su temperatura está por debajo de los -195°C .
3. Limpiar el tubo con Etanol al 70% y colocarlo en la campana, se puede utilizar un pequeño BM para llevar el tubo a 37°C , tratar de hacer este paso en forma rápida pero sin que sea un cambio de temperatura brusco.
4. Una vez que el contenido del criotubo se ha descongelado, vaciarlo en el tubo de centrifuga de 15 mL.
5. Agregar lentamente un mL de medio suplementado y posteriormente complementar un volumen de 10 mL.
6. Centrifugar a 1000 rpm (90 g), durante 5-8 min.
7. Después de la centrifugación seguir trabajando en la campana. Desechar el sobrenadante, puede ser por decantación o bien por aspiración cuidando de no llevarse el paquete celular.
8. Agregar 10 mL de medio suplementado fresco y homogenizar el botón celular.
9. Una vez homogenizado, pasar el medio con las células a una botella de cultivo o a una caja Petri.
10. Colocar en la incubadora a 37°C , 5 % de CO_2 y humedad a saturación.
11. Realizar observaciones cada 24 h, utilizando el microscopio invertido.
12. Durante el cultivo se recomienda hacer el recambio de medio cada 48 h aproximadamente.

Resultados

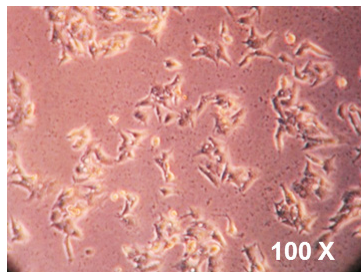
Durante 8-10 días (o hasta que las células lleguen a confluencia), realiza observaciones de la proliferación celular, utilizando el microscopio invertido cada 24 h y anota los cambios que se pueden apreciar en cada día, de ser posible obtener un registro fotográfico del cultivo.

Día: cero	Día: 3	Día: 6
Día: 1	Día: 4	Día: 7
Día: 2	Día: 5	Día: 8

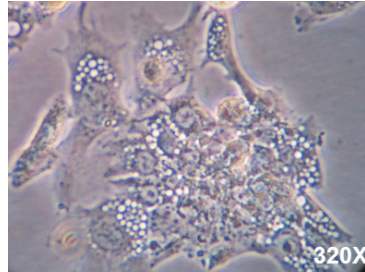
Como muestra se presentan algunas microfotografías de la proliferación de células HepG2 a diferentes días.



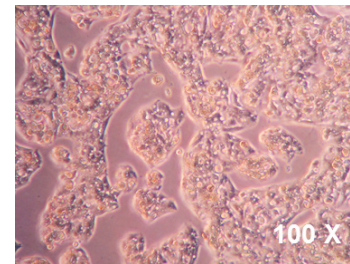
Día: cero



Día: 3



Día: 5



Día: 8



Análisis de Resultados

Conclusión



Cuestionario

1. Investigar y definir que es:
 - a. Línea celular.
 - b. Criopreservación.
2. ¿Cuál es la importancia de realizar una descongelación celular adecuada?
3. ¿Qué factores influyen para realizar un cultivo celular óptimo?
4. ¿Qué cuidados se deben tener al trabajar con nitrógeno líquido y cuáles podrían ser los efectos si se tiene contacto directo con él?
5. Definir el significado e implicaciones de la confluencia celular.

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.

Referencias electrónicas

-  Cultek. Sección Técnica de Células Madre. Recuperado de http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/celulas%20madre/celulas_madre_tecnicas.pdf (Se ingresó el 30 de enero del 2014).
-  Ramos Gómez M, Martínez-Serrano A. (2008). Universidad Autónoma de Madrid. Curso de Cultivos Celulares. Recuperado de http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/lde/viat/_private/BIOQ%20EXPIII/CursocultivosUAM2008.pdf (Se ingresó el 5 de marzo de 2015).

Práctica 3

Cosecha, resiembra y conteo de células cultivadas y evaluación de la viabilidad

Introducción

Una vez que el cultivo celular prolifera activamente antes de llegar a confluencia, las células son tratadas con una solución de tripsina normalmente suplementada con EDTA, para levantar las células del sustrato donde están adheridas y separarlas entre sí para disgregarlas. Una vez separadas las células es posible hacer un homogenado celular en el medio de cultivo, y distribuirlo a un área mayor con relación 1:2 o 1:3, para incrementar el número de células disponibles, o bien, para sembrar un número específico de células para realizar un experimento.

Cuando las células son resembradas para experimentar en ellas, es necesario sembrar un número definido de células para lo cual se requiere hacer el conteo celular, el cual se realiza de una alícuota del homogenado celular, utilizando la cámara de Neubauer o un hemocitómetro, de manera convencional, o bien por métodos automáticos como es la utilización de un equipo contador de células.

También es importante que las células que se siembran sean viables, lo cual es posible cuantificar mediante la utilización de colorantes vitales de exclusión, como el azul de tripano, que tiñe células no viables y las viables permanecen sin color ya que la membrana plasmática impide la incorporación del colorante.

Objetivos

- Hacer resiembra de células cultivadas.
- Conocer la cámara de Neubauer y su uso para el conteo celular.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe ser esterilizado previamente.

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
 - 1 Mechero.
 - 1 Cámara de Neubauer.
 - 1 Pipeteador automático.
 - 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
 - 1 Piceta con Etanol al 70%.
 - 1 Botellas de cultivo de 75 cm² o cajas Petri para cultivo.
 - 1 Campana de flujo laminar.
 - 1 Incubadora.
 - 1 Baño María (BM).
 - 1 Microscopio invertido.
 - 1 Cámara fotográfica adaptable al microscopio.
- Células cultivadas: línea celular HepG2, Núm. de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Etanol (J.T. Baker).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).
- Azul de tripano (Sigma).

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05%de tripsina y 0.02 % de EDTA en solución amortiguadora.
- Solución de antibiótico-antimicótico se vende comercialmente, contiene penicilina, estreptomina, anfotericina y fungizona.
- Medio de cultivo suplementado: A una botella con 500 mL de medio Williams, agregar SFB para tener una concentración entre el 8-10%, agregar solución de antibiótico a una concentración final del 1% y etiquetar.
- Etanol al 70 %.
- Solución de PBS con EDTA 2 mM.
- Azul de tripano al 0.4% en PBS.

Células cultivadas: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.

Procedimiento

A. Resiembra de células.

1. Una botella o caja Petri de cultivo con células formando una monocapa y en crecimiento exponencial.
2. Desechar el medio de cultivo.
3. Agregar PBS en un volumen igual al que tenían de medio de cultivo, para lavar las células y desechar.
4. Repetir el lavado con PBS.
5. Agregar una alícuota de PBS con EDTA y dejar reposar 2-3 min, y desechar. Este paso depende del tipo celular, se emplea para cultivo de la Línea celular HepG2.
6. Agregar una alícuota de tripsina-EDTA, 0.5 - 1.0 mL, para una botella de cultivo de 25 o 75 cm², inclinando la botella para formar una capa superficial sobre las células. Incubar 1-3 min en la incubadora, dependiendo de qué tan activa está la tripsina.

7. Golpear suavemente la caja de cultivo para ayudar mecánicamente a separar las células. Una vez despegadas las células re-suspenderlas en un volumen de medio de cultivo y homogenizar cuidadosamente con una pipeta serológica, evitando hacer burbujas o espuma con el medio de cultivo, ya que esto alteraría el conteo celular.

B. Conteo y Viabilidad Celular.

1. Homogenizar las células, tomar una alícuota de aproximadamente 50 μL y mezclarla con un volumen igual de la solución de azul de tripano. La mezcla se recupera con un micropipeta y se coloca en la cámara de Neubauer en el lado A.
2. Repetir el procedimiento anterior y colocar una muestra en el lado B.
3. Contar las células viables (refringentes), es decir, aquellas que no incluyeron el colorante, de los 9, 5, 3 o un cuadrante (esto depende la densidad celular) del lado A y del lado B. Se tiene que tener un número similar en ambos lados (por ejemplo 89 con 80, o 120 con 130), y obtener un promedio el cual se multiplica por el factor 1×10^4 , para obtener el número celular por mL de medio. Si el valor es muy diferente (por ejemplo 80 con 40 o 120 con 80) repetir el conteo.

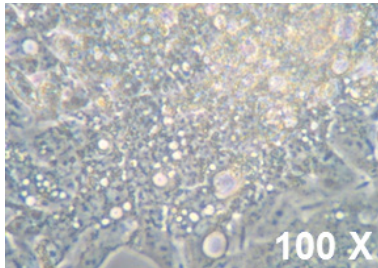


4. Obtener el número total de células, considerando el volumen total.
5. Si se requiere determinar el número de células muertas, contar las que se observan en color azul oscuro (células muertas).
6. Realizar los cálculos para re-sembrar un número específico de células viables por cm^2 .
7. Colocar en la incubadora y realizar observaciones cada 24 h, utilizando el microscopio invertido.
8. Durante el cultivo, cambiar el medio por medio fresco, cada 48 h.

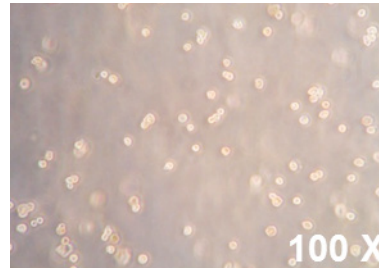
Resultados

A) Observaciones: Tomar una fotomicrografía de células en confluencia, antes de exponerlas a la tripsina y posteriormente de despegarlas con la tripsina.

Como muestra se presentan microfotografías de células HepG2.



Células en confluencia



Células tripsinizadas

B) **Conteo celular.**

No. de células	Promedio	No. de Células /mL	No. Total de Células.
A			
B			

C) **Viabilidad Celular:**

No. de células vivas	Promedio	No. de Células /mL	No. Total de Células.
A			
B			
No. de células muertas	Promedio	No. de Células /mL	No. Total de Células.
A			
B			

Porcentaje de Viabilidad Celular: _____.




Análisis de Resultados

Conclusión




Cuestionario

1. Indicar ¿que es la tripsina y cuál es su efecto sobre el cultivo celular?
2. ¿Qué es el EDTA y cuál es su función sobre el cultivo celular?
3. ¿Qué es el azul de tripano y cuál es el principio por el cual se puede determinar con él la viabilidad celular?
4. ¿Qué otras técnicas para determinar viabilidad en cultivo celular existen y cuál es su fundamento?
5. ¿Cuál es la importancia de realizar un conteo celular y en qué casos es relevante?

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.
-  Ramírez Romero P, Mendoza Cantú A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. 1ra ed. México D.F., México.

Referencias electrónicas

-  Bastida O. (2012). Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. Celeromics. . Recuperado de: <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cell-article-chamber.php> (Se ingresó el 5 de marzo de 2015).
-  Cultek. Sección Técnica de Células Madre. Recuperado de http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/celulas%20madre/celulas_madre_tecnicas.pdf (Se ingresó el 5 de marzo de 2015).
-  Ramírez P y Mendoza A. (Compiladoras). (2008). Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Instituto Nacional de Ecología. Azul de tripano. Recuperado en <http://books.google.com.mx/books?id=wdJWUOj81isC&pg=PA247&lpg=PA247&dq=azul+de+tripano+preparar&source=bl&ots=DwWbWs0aqR&sig=xVL9MDSp6X5HZrT2AazMke8euh4&hl=es&sa=X&ei=9SSGUNSQFsalqQGeo4GIAg&ved=0CFAQ6AEwBg#v=onepage&q=azul%20de%20tripano%20preparar&f=false> (Se ingresó el 5 de marzo de 2015).

Práctica 4

Prueba de funcionalidad mitocondrial

Introducción

Las pruebas de citotoxicidad son muy variadas y permiten conocer si las células están siendo afectadas en su funcionalidad por la exposición a un estímulo. En algunos casos estas pruebas permiten conocer qué organelo o parte celular es la que se está alterando específicamente.

Para determinar si las células están experimentando citotoxicidad es posible medir metabolitos o enzimas dentro de las células, o bien, componentes que se encuentren presentes en el medio, al ser excretados o debido a su liberación por la pérdida de la integridad celular. Ejemplo de éstos últimos componentes pueden ser: lactato deshidrogenasa y transaminasas, como la glutámico pirúvica o la glutámico oxaloacética, las cuales al estar incrementadas en el medio son muestra del daño que ha experimentado las células por acción de un agente tóxico.

Otra prueba utilizada para determinar citotoxicidad o funcionalidad celular es la del MTT, la cual es específica para detectar daño a nivel mitocondrial.

Nota: Estas pruebas son utilizadas para determinar la funcionalidad celular ante la exposición de un tratamiento citotóxico, por lo que es necesario contar con un control positivo (células que han sido cultivadas en ausencia del agente citotóxico).

Objetivos

- Determinar la funcionalidad celular, mediante las pruebas del MTT.
- Determinar si un tóxico ejerce daño a nivel mitocondrial.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
 - 2 Celdas de vidrio para leer en espectrofotómetro.
 - 1 Mechero.
 - 1 Pipeteador automático o perillas.
 - 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
 - 1 Piceta con etanol al 70%.
 - 1 Placas multipozos de 6 o cajas Petri de 60 mm.
 - 1 Campana de flujo laminar.
 - 1 Incubadora.
 - 1 Baño María.
 - 1 Microscopio invertido.
 - 1 Espectrofotómetro.
 - 1 Cámara fotográfica adaptada al microscopio.
- Células cultivadas: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).

- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Etanol (J.T. Baker).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) (Sigma).
- HCl (J.T. Baker).
- Isopropanol (J.T. Baker).
- Etanol (J.T. Baker).
- Agente tóxico, puede ser $HgCl_2$, $CdCl_2$ u otro.

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (phosphate buffered saline, (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05% de tripsina y 0.02 % de EDTA en solución amortiguadora.
- Solución de antibiótico-antimicótico se vende comercialmente, contiene penicilina, estreptomina, anfotericina y fungizona.
- Medio de cultivo suplementado: A una botella con 500 mL de medio Williams, agregar SFB para tener una concentración entre el 8-10%, agregar solución de antibiótico a una concentración final del 1% y etiquetar.
- Etanol al 70 %.
- Solución de PBS con EDTA 2 mM.
- Solución de MTT: 0.5 mg/mL en medio de cultivo a pH=7.5.*
- Solución de HCl 0.04N en 2-isopropanol.

* Se recomienda preparar una solución estándar 10X en PBS y diluir posteriormente en medio de cultivo celular.

Procedimiento

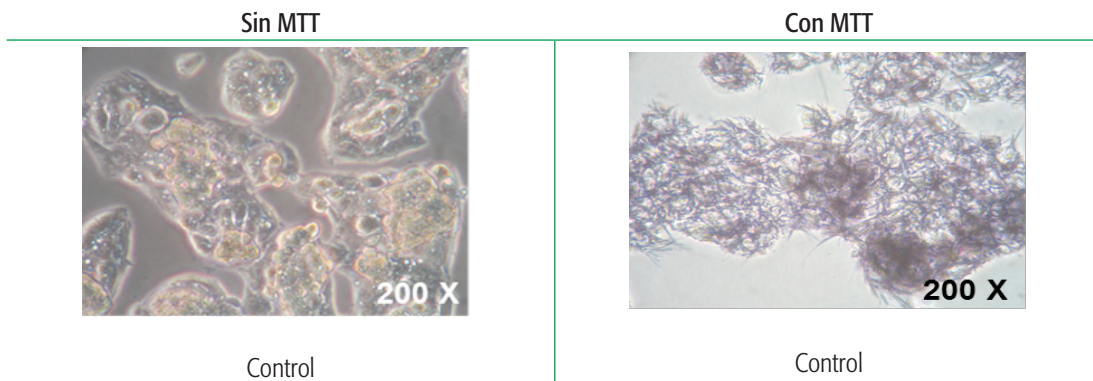
1. Sembrar las células en placas de cultivo de 6 pozos de 8.6 cm², a una densidad de 50 000 células /cm².
2. Incubar en las condiciones estándar y dejar que se adhieran al menos 24 h.
3. Ya adheridas las células. Aplicar un tratamiento con un agente tóxico (el que es de su interés), contar con el cultivo celular que servirá como control (no contiene el agente tóxico). El tratamiento puede ser dependiente de diversos agentes, concentraciones o tiempos de exposición.
4. Al término del tratamiento, lavar las células con una alícuota de solución de PBS y desechar el excedente.
5. Agregar una alícuota de la solución de MTT, suficiente para cubrir las células.
6. Incubar las células con el MTT por 3 h a 37°C y 90 % de humedad. Proteger de la luz con papel aluminio.
7. Posteriormente, desechar la solución de MTT. Lavar las células con PBS y desechar el volumen restante.
8. Agregar 500 µL de una solución de HCl 0.04N en 2-isopropanol, y agitar la placa durante 15 min.
9. Obtener el formazán solubilizado y leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.
10. Expresar la funcionalidad celular (mitocondrial) como porcentaje de la absorbancia con respecto a la absorbancia del control.

Resultados

Observaciones: Tomar una fotomicrografía de células en cultivo, del control y las expuestas a los diferentes tratamientos, antes de extraer los colorantes.

Sin MTT	Con MTT
Control	Control
Tratamiento 1	
Tratamiento 2	

Como muestra se presentan microfotografías de células HepG2, sin y con MTT



Obtener las densidades ópticas y graficar los resultados para MTT

Tratamiento	Absorbancia (D.O.)
Control	
Tratamiento 1	
Tratamiento 2	







Análisis de Resultados

Conclusión

Cuestionario

1. ¿Qué es el MTT? Escribe la reacción en que se basa la prueba del MTT y cita la enzima que interviene.
2. ¿Explicar cuál es el agente citotóxico empleado y su efecto sobre las células?
3. ¿Explicar por qué el MTT es utilizado como prueba de funcionalidad y su importancia?
4. Mencionar otras técnicas empleadas para determinar citotoxicidad celular, indicando la molécula blanco y organelo celular implicado.

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.
-  Loumbourdis N, Danscher G. (2008). Autometallographic tracing of Hg-S quantum dots in foros exponed to inorganic mercury. Biometals, 21: 311-319.
-  Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65: 55-63.
-  Omata, S., Kasama, H., Hasegawa, H., Hasegawa, K., Ozaki, K., Sugano, H. (1986). Species difference between rat and hamster in tissue accumulation of mercury after administration of methylmercury. Arch. Toxicol. 59: 249-254.
-  Santos, A.C., Uyemura, S.A., Santos, N.A., Mingatto F.E., Curti, C. (1997) Hg (II)-induced renal cytotoxicity: *in vitro* and *in vivo* implications for the bioenergetic and oxidative statuso f mitochondria. Mol. Cell. Biocleml. 177: 53-59.

Práctica 5

Prueba de funcionalidad lisosomal

Introducción

Las pruebas de citotoxicidad son muy variadas y permiten conocer si las células están siendo afectadas en su funcionalidad por la exposición a un agente físico o químico. En algunos casos estas pruebas permiten conocer que organelo o parte celular es la que se está alterando específicamente.

La prueba de rojo neutro permite conocer si las células han experimentado citotoxicidad particularmente a nivel de lisosoma.

Nota: Estas pruebas son utilizadas para determinar la funcionalidad celular ante la exposición de un tratamiento citotóxico, por lo que es necesario contar con un control positivo (células que han sido cultivadas en ausencia del agente citotóxico).

Objetivos

- Conocer y manejar la técnica con rojo neutro.
- Determinar la funcionalidad celular, mediante la prueba del Rojo neutro.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
 - 1 Mechero.
 - 1 Cámara de Neubauer.
 - 1 Pipeteador automático o perillas.
 - 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
 - 1 Piceta con etanol al 70%.
 - 1 Placas multipozos de 6 pozos.
 - 1 Campana de flujo laminar.
 - 1 Incubadora.
 - 1 Baño María (BM).
 - 1 Microscopio invertido.
 - 1 Espectrofotómetro.
 - 1 Cámara fotográfica adaptada al microscopio.
- Células cultivadas: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).
- Etanol (J.T.Baker).
- EDTA (Sigma).

- CaCl_2 (J.T.Baker).
- Formaldehído (J.T. Baker).
- Ácido acético (J.T.Baker).
- 3-amino-7 dimetil-2metilfenacina hidrocloreuro o Rojo neutro (RN) (Sigma).
- HCl (J.T.Baker).

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05% de tripsina y 0.02 % de EDTA en solución amortiguadora.
- Solución de antibiótico-antimicótico se vende comercialmente, contiene penicilina, estreptomina, anfotericina y fungizona.
- Medio de cultivo suplementado: A una botella con 500 mL de medio Williams, agregar SFB para tener una concentración entre el 8-10%, agregar solución de antibiótico a una concentración final del 1% y etiquetar.
- Etanol al 70 %.
- Solución de PBS con EDTA 2 mM.
- Solución de RN: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de cultivo a $\text{pH}=7.5$.
- Solución fijadora de CaCl_2 al 1.0 % y formaldehído al 0.5%.
- Solución de ácido acético al 1% y etanol al 50%.

Procedimiento

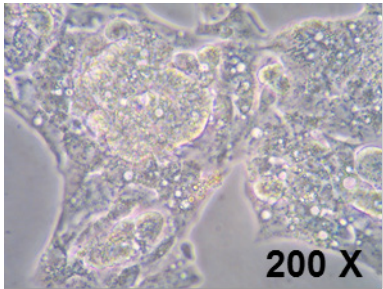
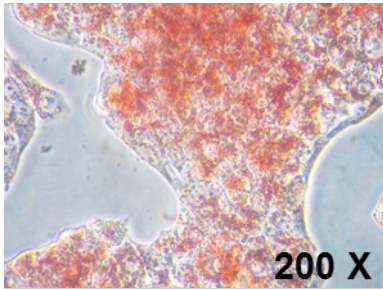
A. Prueba del Rojo neutro (RN).

1. Sembrar las células en placas de cultivo de 6 pozos de 8.6 cm^2 , a una densidad de 50 000 células / cm^2 .
2. Incubar en las condiciones estándar y dejar que se adhieran al menos 24 h.
3. Ya adheridas las células. Aplicar un tratamiento con un agente citotóxico (el que es de su interés), contar con el cultivo celular que servirá como control. (No contiene el agente citotóxico). El tratamiento puede ser dependiente de diversos agentes, concentraciones o tiempos de exposición.
4. Al término del tratamiento, lavar las células con una alícuota de solución de PBS y desechar el excedente.
5. La solución de Rojo neutro se incuba previamente durante 24 h y se centrifuga a 2000g, durante 10min.
6. Agregar una alícuota de la solución de RN suficiente para cubrir la monocapa celular.
7. Incubar las células con la solución de RN por 3 h a 37°C y 90 % de humedad.
8. Posteriormente, retirar el colorante y lavar las células rápidamente con una solución fijadora de CaCl_2 y formaldehído al 0.5%
9. Enseguida, agregar una alícuota de solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% y agitar a temperatura ambiente durante 10 min, para extraer el colorante.
10. Leer la absorbancia del colorante extraído, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
11. Expresar la funcionalidad celular (lisosómica) como porcentaje de la absorbancia con respecto a la absorbancia del control.

Resultados

Observaciones: Tomar fotomicrografías de células en cultivo, del control y las expuestas a los diferentes tratamientos, antes y después de la exposición del RN.

A continuación se muestran microfotografías de células HepG2 con y sin RN, como muestra.

Sin RN		Con RN	
			
Control		Control	
Tratamiento 1			
Tratamiento 2			

Obtener las densidades ópticas y graficar los resultados para RN.

Tratamiento	Absorbancia (D.O.)
Control	
Tratamiento 1	
Tratamiento 2	







Análisis de Resultados

Conclusión

Cuestionario

1. Indicar qué es el rojo neutro (RN) y la reacción en que se basa su funcionalidad.
2. Indicar cuál y qué es el agente citotóxico empleado y su efecto sobre las células.
3. Explicar por qué el RN es utilizado como prueba de funcionalidad y su importancia.
4. Mencionar otras técnicas empleadas para determinar citotoxicidad celular, indicando la molécula blanco y organelo celular implicado.

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.
-  Loumbourdis N, Danscher G. (2008). Autometallographic tracing of Hg-S quantum dots in foros exponed to inorganic mercury. *Biometals*, 21: 311-319.
-  Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
-  Omata, S., Kasama, H., Hasegawa, H., Hasegawa, K., Ozaki, K., Sugano, H. (1986). Species difference between rat and hamster in tissue accumulation of mercury after administration of methylmercury. *Arch. Toxicol.* 59: 249-254.
-  Santos, A.C., Uyemura, S.A., Santos, N.A., Mingatto F.E., Curti, C. (1997). Hg(II)-induced renal cytotoxicity: *in vitro* and *in vivo* implications for the bioenergetic and oxidative statuso f mitochondria. *Mol. Cell. Biocleml.* 177: 53-59.

Práctica 6

Lisis de células cultivadas y cuantificación de proteína (método BCA)

Introducción

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula y constituyen más del 50% del peso seco de la célula. Cada tipo celular tiene un papel específico determinado por su composición proteica.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, basados en:

- La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el rango UV.
- La formación de derivados químicos.
- La capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

El primer método para cuantificar proteínas fue establecido en 1959 por Biuret, el cual se hizo más eficiente y sensible por Lowry y, posteriormente, fue modificado por Bradford. Cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas, y son empleados dependiendo de las necesidades y disponibilidad de los reactivos que tenga el investigador.

Actualmente es posible utilizar el método del ácido bicinónico que permite determinar la cantidad de proteínas en una muestra de hasta 5 μ L, en placas de 96 pozos con ahorro de tiempo y con mayor sensibilidad.

La determinación de proteína celular es un parámetro de suma importancia, ya que:

- Al determinar en un experimento la cantidad de un metabolito o una enzima, ésta debe referirse por mg de proteína para establecer un parámetro real de comparación.
- En algunos ensayos se requiere utilizar una cantidad específica de proteína celular o nuclear, por ejemplo en el Western-blot (WB) para determinar la expresión de una proteína específica.

Objetivos

- Realizar un método rápido y de alta sensibilidad para determinar proteínas.
- Determinar la cantidad de proteínas en una muestra celular.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Extracción de proteínas.	Cuantificación de proteína.
10 Tubos eppendorf.	1 Placa de 96 pozos.
1 Microcentrífuga.	1 Micropipeta de 100-1000 mL.
1 Gradilla para tubos eppendorf.	1 Micropipeta de 10-100 mL.
1 Micropipeta de 10-100 mL.	1 Micropipeta de 1-20 mL.
1 Micropipeta de 100-1000 mL.	30 Puntas para micropipetas.
4 Pipetas Pasteur.	1 Kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce).
4 Raspadores de células (gendarme).	1 Lector de placas de ELISA/filtro para 562 nm. ó
1 Homogenizador automático.	1 Lector de placas DTX (Multimode Detector, Beckman Coulter) a 562nm.
1 Centrífuga.	
Células cultivadas: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.	

Reactivos

- Kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce).
- Pastilla de Complete, 3-amino-7 dimetil-2metilfenacina hidrocloreuro (Sigma).
- Tris-HCl (Sigma).
- NaCl (J.T. Baker).
- IGEPAL (Sigma).
- NaF (Sigma).
- NaOV₃ (Sigma).
- Albúmina sérica bovina (Sigma).

Soluciones

- Para la **extracción de proteínas**. (Las proteínas pueden emplearse para realizar el WB).
 - Complete: disolver una pastilla en 2 mL de agua des-ionizada y estéril. Hacer alícuotas y guardar en frasco obscuro a -4°C. Se emplea para ensayos de Western-blot.
 - Solución buffer de lisis para obtener proteína:
Para preparar 50 mL de amortiguador de lisis agregar: 0.394 g de tris-HCl, 0.350 g de NaCl y 0.250 µL de IGEPAL, llevar a pH de 8:0. Agregar 80 µL de Complete / mL de buffer de lisis. Agregar inhibidores de fosfatasas: 0.210 g de NaF y 0.0012 g de NaOV₃. Ajustar a pH 8.0 (ya agregado todo).
- Para la **cuantificación de proteínas**.
 - El Kit comercial de BCA, contiene los reactivos A y B a partir de los cuales se prepara una solución de reacción (50:1 de los reactivos A y B).
 - Diluir los estándares de proteína como se indica en el Kit. O bien preparar una solución estándar de albúmina de 100 a 1000 µg/mL.

Procedimiento

A) Extracción de proteínas.

1. Caja Petri con células en semiconfluencia (2.5 x 10⁶ células).
2. Lavar con PBS frío. Poner previamente la botella de PBS en hielo.
3. Quitar el exceso de PBS con micropipeta.
4. Agregar 200 µL de buffer de lisis, a cada una de las cajas Petri.
5. Dejar las cajas con el buffer de lisis, sobre hielo durante 15 min, moviendo cada 5 min para que se lisen las células.
6. Raspar con gendarme y homogenizar con la punta (20-30 veces).
7. Poner todo el volumen en un eppendorf de 1.5 - 2 mL.
8. Centrifugar durante 15 min a 14 000 rpm (15000 g) a 4°C.
9. Recuperar el sobrenadante con cuidado de no tomar el pellet y alícuotar.

B) Cuantificación de proteína.

1. Se cuantificará la cantidad de proteína en muestras de homogenado celular o de tejido, mediante la utilización del Kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce), para ello se utilizará una curva estándar de albúmina con diferentes concentraciones:

Estándar	Concentración final de BSA ($\mu\text{L}/\text{mL}$).
A	2,000
B	1,500
C	1,000
D	750
E	500
F	250
G	125
H	25
I	0

2. Se colocarán 25 μL de cada estándar en una placa multipozos, y 5 μL de las muestras problema más 20 μL de agua destilada.
3. Adicionar 200 μL del reactivo de BCA (preparado 50:1 con los reactivos A y B), y se incuba a 37°C por 30 minutos.
4. Posteriormente se lee la placa en un lector de placas DTX Multimode Detector (Beckman Coulter) a 562nm.

Se realizan los cálculos para determinar la cantidad de proteína / mL de muestra.

Resultados

- a) Hacer una tabla con los datos de densidad óptica correspondientes a la curva patrón y a los problemas.

Pozos	Proteína (μg)	Absorbancia
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		

- b) Hacer la gráfica de la curva patrón.
- c) Mediante la ecuación de la línea recta correspondiente a la curva patrón, determinar la cantidad de proteína para cada una de las muestras problemas.


Análisis de Resultados

Conclusión


Cuestionario

1. Indicar cuál es la función del “complete” y dar ejemplos de reactivos similares a éste.
2. Indicar qué es una curva patrón.
3. Referir en qué se basa la técnica del BCA para reaccionar con las proteínas.
4. ¿Por qué se leen las muestras a una longitud de 562 nm?
5. ¿Qué ventajas ofrece este ensayo con respecto al método de Bradford y Lowry?

Bibliografía

-  Fernández Reyes E. Galván Cejudo A. 2010. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Córdoba. España.

Referencia electrónica

-  Universidad Nacional de Quilmes. (2010). Extracción y cuantificación de proteínas. Introducción a Biología Celular y Molecular. Recuperado de: <http://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp2.pdf>. (Se ingresó el 5 de marzo del 2015).

Práctica 7

Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica y obtención de cromosomas

Introducción

Otra técnica del cultivo celular es la del cultivo celular en suspensión (como los linfocitos). Las células suspendidas en un medio líquido proliferan pues deben estar en un ambiente tal, que las condiciones de cultivo sean lo más parecido a las del origen.

Esta técnica es empleada en citogenética para la realización de cariotipos (estudio de cromosomas y su relación con alteraciones que se puedan presentar en los organismos), así como su relación con aspectos clínicos que presenten los pacientes.

El cultivo de linfocitos y la observación de los cromosomas se basa en la capacidad que tienen estas células para proliferar en presencia de un inductor de la división celular o mitógeno y la utilización de un agente mitostático que permite detener la división celular en la metafase.

Objetivos

- Conocer las bases del cultivo celular en suspensión mediante un cultivo de linfocitos de sangre periférica.
- Favorecer la proliferación celular y obtener un mayor número de células en mitosis en presencia del agente mitostático, en comparación a un control negativo.
- Observar en el microscopio los cromosomas obtenidos para calcular el índice mitótico.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe ser esterilizado previamente.

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
 - 1 Tubo cónico para centrifuga de 15 mL.
 - 2 Mecheros.
 - 2 Jeringas.
 - 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
 - 1 Piceta con Etanol al 70%.
 - 1 Centrifuga.
 - 3 Pipetas Pasteur y bulbos.
 - 20 Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
 - 1 Campana de flujo laminar (opcional se puede trabajar entre 2 mecheros).
 - 1 Incubadora.
 - 1 Microscopio invertido.
 - 1 Cámara fotográfica adaptada al microscopio.
- Sangre completa.

Reactivos

- Medio Mc Coy 5A (Sigma).
- Heparina (Microlab).
- Colchicina (Microlab).
- Fitohemaglutinina (Microlab).
- Penicilina- estreptomycin al 10% (In Vitro).
- Etanol (J.T. Baker).
- Ácido acético (J.T. Baker).
- KCl (J.T. Baker).
- Colorante de Giemsa (Merck).

Soluciones

- Sol. Hipotónica de KCl al 0.4 %.
- Etanol al 70 %.
- Colchicina al 0.1%, pesar 0.1 g de colchicina, disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

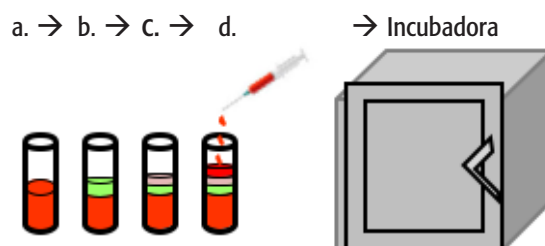
Procedimiento

A) Cultivo o siembra.

1. Obtener una muestra de sangre humana (3-5 mL) con una jeringa estéril y heparinizada.



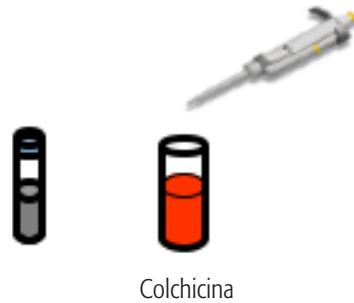
2. Vaciar en un tubo de 15 mL, estéril y etiquetado, las siguientes soluciones en el orden aquí establecido:
 - a. 2.5 mL de Medio Mc Coy 5A.
 - b. 0.16 mL de Fitohemaglutinina.
 - c. 0.016 mL de antibiótico.
 - d. 3.0 mL de sangre completa (6 gotas). Vaciar las gotas de sangre quitando la punta metálica de la jeringa para no romper más, la muestra celular.
 - e. Cerrar el tubo y homogenizar suavemente la mezcla.



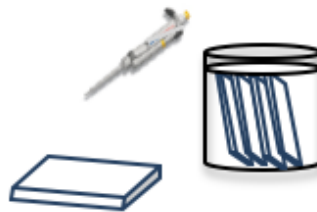
3. Llevar el tubo a una incubadora a 37 °C por 72 o 96 h máximo, para realizar el cultivo celular.

B) Cosecha y obtención de cromosomas.

1. Una hora antes del cultivo añadir 2 mL o 4 gotas de colchicina al cultivo.



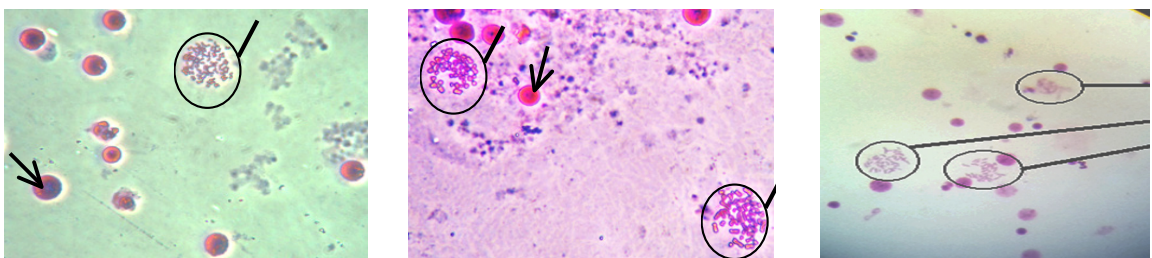
2. Transcurrida la hora, centrifugar el tubo con las células de cultivo a 1500 rpm (200 g) por 10 minutos y eliminar el sobrenadante. (Es posible apreciar una fase suspendida, en donde se encuentran los linfocitos).
3. Vaciar solución hipotónica de KCl al 0.4 % hasta llegar a 10 mL. Incubar durante 30 minutos. (Se recomienda vaciar un poco de solución, resuspender y después vaciar el resto y volver a resuspender y homogenizar).
4. Centrifugar la muestra a 1500 rpm (200 g) por 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
5. Agregar una alícuota de solución fijadora (etanol: ácido acético, 3:1) hasta llegar a un volumen de 10 mL y centrifugar a 1500 rpm (200 g) por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
6. Repetir el lavado con solución fijadora, igual hasta 10mL y centrifugar a 1500 rpm (200 g) por 10 minutos, repetir nuevamente. Eliminar la mayor cantidad de sobrenadante y resuspender el botón celular con lo que queda de fijador.
7. Gotear el botón celular sobre láminas portaobjetos, las cuales previamente se sumergieron en solución fijadora enfriada en el congelador, a una distancia de altura considerable para favorecer el rompimiento de las células.



8. Soplar un poco el contenido de la laminilla para distribuirlo y esperar a que seque.
9. Teñir la muestra con Giemsa al 4% durante 20 minutos. Observar las preparaciones al microscopio de campo claro para monitorear la dispersión de los cromosomas en la metafase y determinar el índice mitótico.

Resultados

Observaciones: Tomar fotomicrografías de células en interfase y en mitosis.



Las células en interfase se indican con → y las células en mitosis se muestran encerradas en un círculo.

Determinar el índice mitótico.

Utilizando el microscopio de campo claro a un aumento de 100X para observar las mitosis. Elegir varios campos y calcular del índice mitótico usando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{Número de metafases}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$




Análisis de Resultados

Conclusión

Cuestionario

1. Definir brevemente en qué consiste un cultivo celular en suspensión y uno en monocapa.
2. ¿Qué tipo de células son cultivadas en suspensión y cuál es la razón?, cita 2 ejemplos.
3. ¿Qué tipo de células son los linfocitos?
4. Describir brevemente las fases de la división celular.
5. ¿Qué es un cariotipo?
6. ¿Qué es el índice mitótico?
7. Definir el concepto de mitógeno y mitostático, y referir algunos ejemplos.

Bibliografía

-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.
-  Verma, R.S., y Babu, A. (1995). Human Chromosomes. Principles and Techniques. 2ª Ed. Mc Graw-Hill. Estados Unidos. 419p.

Referencia electrónica

-  Navarro López Carlos. Universidad de Valencia. Departamento de Biología. El cariotipo humano. Recuperado de: <http://mural.uv.es/monavi/disco/primero/biologia/Tema35.pdf> (Se ingresó el 5 de marzo del 2015).

Práctica 8

Congelamiento de líneas celulares

Introducción

La criopreservación es una técnica que tiene como objetivo mantener y almacenar células o material biológico viable y funcional, por un tiempo prolongado (meses, años), al colocarlo bajo ciertas condiciones en un tanque de nitrógeno líquido, cuya temperatura llega a ser de $-195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión de una atmósfera.

La criocongelación de líneas celulares permite al investigador contar con un acervo celular disponible en el momento que lo requiera, o bien, el almacenar una población celular que por el momento no se utilice.

Al congelar las células se debe considerar el uso de un adecuado criopreservador que impida se formen cristales de agua, los cuales ocasionarían un rompimiento de los organelos y por lo tanto de la integridad celular.

Por otra parte, las células al ser descongeladas mantienen su viabilidad y características que permiten la proliferación continua para el desarrollo de innumerables ensayos en investigación.

Objetivos

Realizar la técnica de congelamiento de una línea celular.

Preservar de células por tiempos prolongados (días, meses, años).

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe ser esterilizado previamente.

- 6 Pipetas serológicas de 10 mL o 5 mL.
- 2 Tubo cónico para centrifuga de 15 mL.
- 1 Mechero.
- 1 Hemocitómetro o cámara Neubauer.
- 1 Pipeteador automático o perilla.
- 1 Vaso de precipitados o frasco para contener desechos.
- 1 Piceta con Etanol al 70%.
- 1 Botella de cultivo de 75 cm^2 con células HepG2 confluentes.
- 10 Criotubos, etiquetados con la línea celular, el pasaje, la fecha y el nombre de la persona que realizó el congelamiento.
- 1 Campana de flujo laminar.
- 1 Incubadora.
- 1 Baño María (BM).
- 1 Microscopio invertido.
- 1 Cámara fotográfica adaptada al microscopio.
- Ultra-congelador ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).
- Etanol (J.T.Baker).
- EDTA (Sigma).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (J.T. Baker).

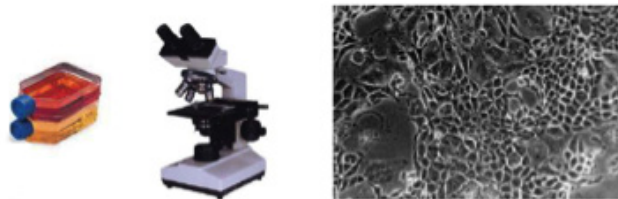
Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución de tripsina-EDTA se vende comercialmente, contiene 0.05% de tripsina y 0.02 % de EDTA en solución amortiguadora.
- Solución de antibiótico-antimicótico se vende comercialmente, contiene penicilina, estreptomina, anfotericina y fungizona.
- Medio de cultivo suplementado: A una botella con 500 mL de medio Williams, agregar SFB para tener una concentración entre el 8-10%, agregar solución de antibiótico a una concentración final del 1% y etiquetar.
- Etanol al 70 %.
- Solución de PBS con EDTA 2 mM.
- Células cultivadas en confluencia: línea celular HepG2, número de ATCC: HB-8065 u otro tipo celular.

Procedimiento

A) Cosecha celular y conteo celular.

1. Observar al microscopio las células en cultivo que se van a congelar para asegurarnos que no haya contaminación.



Células en monocapa

2. Flamear la botella de cultivo y decantar medio de cultivo en el matraz de desechos.
3. Lavar dos veces con PBS entre 5 y 10 mL, cubriendo monocapa y agitando suavemente. Decantar.
4. Lavar una vez con 4mL de PBS-EDTA, cuidando que cubra por completo la superficie de la monocapa y dejar actuar durante 1 minuto.
5. Cubrir la monocapa con una cantidad menor a 1mL de solución de tripsina (0.5 a 0.8 mL aproximadamente) e incubar por dos minutos aproximadamente. Observar atentamente la monocapa una vez agregada la tripsina, esta tiene un tiempo de acción entre 2 y hasta 5 minutos.

6. Agregar 12 mL de medio Williams y homogeneizar la monocapa pipeteando enérgicamente. Teniendo cuidado de deshacer los cúmulos celulares pipeteando reiteradamente.
7. Medir el volumen de la suspensión con la pipeta y tomar una alícuota de 500ul para contar las células en el hemocitómetro.

B) Congelamiento.

1. Vaciar la suspensión celular a un tubo de 15 mL estéril y centrifugar a 3,000 rpm (800 g) durante 8 o 10 minutos.
2. Dividir el número de células obtenida en el conteo entre 5 millones, para saber cuántos tubos se van a preparar. Para cada tubo considere que se van a vaciar en total 1.5 mL que se componen de lo siguiente:

Medio de Congelamiento:	80 % de Medio Williams.
	10% de Suero fetal bovino (SFB).
	10% de DMSO. _____
	100% de medio para congelar.



3. Etiquetar los criotubos con datos de la línea celular pasaje fecha y quien congela dicha muestra.
4. Regresar a trabajar en la campana de flujo, desechar el sobrenadante. Primero agregar el 80% de medio y homogenizar. Después añadir 10% de SFB y finalmente 10% de DMSO para tener un 100%. Homogenizar.
5. Vaciar en cada criotubo 1.5 mL de suspensión. Cerrar bien cada criotubo y llevar al ultra-congelador a -80°C.

Resultados




Análisis de Resultados

Conclusión


Cuestionario

1. Hacer un listado de tipos celulares o material biológico que se ha congelado y mantiene sus propiedades de viabilidad y funcionalidad.
2. Mencionar el nombre de varios criopreservadores utilizados para el congelamiento celular, sus ventajas y desventajas.
3. ¿Qué ventajas y desventajas trae consigo la criopreservación celular?
4. ¿Será posible congelar órganos completos y preservarlos?

Bibliografía

-  Ávila-Portillo Bacter LM, Madero J I, López Bacter C, León Bacter M F, Acosta Bacter Lucía, Gómez C, Delgado L G, Gómez C, Lozano J M, Reguero M T. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 57: 291-300.
-  Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons Wiley-Liss, Inc. 5th ed. New York, USA.
-  Langdon S. P. editor. (2004). Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 360 pp.

Referencia electrónica

-  Universidad Nacional de Quilmes. 2010. Mantenimiento de líneas celulares. Biología Celular y Molecular. Recuperado de: <http://cancer.unq.edu.ar/Tpnr02bis.pdf> (Se ingresó el 5 de marzo del 2015).

Práctica 9

Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de ratón

Introducción

La obtención de células de diferentes órganos de animales para su empleo en experimentos toxicológicos, o moleculares, representa una enorme ventaja con respecto al empleo de líneas celulares. Las líneas celulares, por definición, son células transformadas e inmortalizadas puesto que han perdido muchas propiedades y han ganado otras.

Las células primarias son células que conservan, por un tiempo determinado, sus propiedades normales. Sin embargo, se ha observado que muchos tipos celulares van perdiendo la expresión de proteínas particulares con el tiempo de cultivo e incluso van cambiando su fenotipo. Aún bajo estas consideraciones, el cultivo primario sigue siendo el modelo ideal para el estudio de respuestas celulares en células no transformadas, por ejemplo, la transducción de señales.

Los hepatocitos son las células principales del hígado, en ellas se llevan a cabo prácticamente todas las funciones del órgano y son el modelo por excelencia, para estudios toxicológicos, particularmente, de alimentos o cualquier otro compuesto que este dirigido al consumo humano.

En esta práctica se desarrollará la técnica de la doble perfusión con colagenasa para el aislamiento de hepatocitos de ratón. La obtención de hepatocitos de otros animales de experimentación, particularmente roedores, no dista mucho del presente protocolo.

Objetivos

- Implementar un sistema de perfusión hepática.
- Realizar el aislamiento de hepatocitos.
- Observar y explicar los cambios fenotípicos de los hepatocitos en cultivo a lo largo del tiempo.

Hipótesis

Desarrollada por el alumno.

Material y equipo

Todo el material de cultivo debe esterilizarse previamente.

- 10 Pipetas serológicas de 25, 10, 5 y 1 mL.
- 2 Tubos cónicos para centrifuga de 50 mL.
- 1 Pipeteador automático.
- 1 Jeringa de insulina.
- 4 Suturas quirúrgicas.
- 1 Estuche de disección.
- 1 Embudo de doble fondo.
- 4 Cajas de Petri de 10 cm.
- 1 Catéter 21G.
- 1 Filtro de 100 μm .
- 1 Campana de flujo laminar.
- 1 Incubadora de CO₂ con chaqueta de agua.
- 1 Baño María a 37°C con recirculación.
- 1 Microscopio invertido.

- 1 Bomba peristáltica con líneas de mangueras.
Cinta adhesiva, de preferencia cinta testigo.
- 1 Ratón de 10-12 semanas de edad, idealmente de cepas como CD1, C57bl6 o BALBc.

Reactivos

- Solución buffer de fosfatos (PBS) (Sigma).
- Medio Williams (Sigma).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone).
- Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco).
- Etanol (J.T.Baker).
- EGTA (Sigma).
- Solución salina balanceada de Hank (HBSS) (Gibco).
- Solución salina balanceada de Hank 10X (HBSS) (Sigma).
- HEPES (Sigma).
- NaOH (J.T. Baker).
- Bicarbonato de sodio (J.T. Baker).
- Percoll (Sigma).
- Colagenasa (Sigma).
- Anestésico Avertina (Sigma).
- Azul de tripano (Sigma).

Soluciones

- Solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar con sistema de filtración.
- Medio de cultivo (específico para su cultivo celular). Preparar según indicaciones del producto, llevar a pH de 7.4 y esterilizar por sistema de filtración.
- Suero fetal de bovino (SFB), o bien el requerido para el cultivo, se vende comercialmente.
- Solución salina balanceada de Hank (HBSS), 500 mL, a pH 7.4, sin Ca, Mg ni rojo fenol, suplementada con: 1% de HEPES 1M, 38 mg de EGTA pre-diluida en solución saturada de NaOH. Una vez suplementada la solución debe filtrarse para su esterilización.
- Medio Williams base suplementado, a 500 mL de medio agregar: 2.2 g de bicarbonato de sodio y 1% de HEPES 1M.
- Colagenasa, a 50 mL de medio Williams base se le agrega 35 mg de colagenasa tipo 1, se agita hasta su completa disolución y se esteriliza por filtración con filtros de 0.45 μm .
- Medio de adhesión. 500 mL de medio Williams base suplementado con: 50 mL de suero fetal bovino y 5 mL de antibiótico-antimicótico.
- Solución de percoll. 2.5 mL de percoll o 2.5 mL de solución de Hank 10X.
- Etanol al 70 %.
- Solución de azul de tripano al 0.4% en PBS.

Procedimiento

Preparación del equipo de perfusión

1. El equipo de perfusión se prepara acoplando un embudo de doble fondo a un flujo (Foto 1 y 2) continuo de agua a 37°C al fondo y con una línea de flujo interno del embudo a la bomba peristáltica que controla la velocidad de perfusión hacia el animal.



Foto 1. Equipo de perfusión profesional.

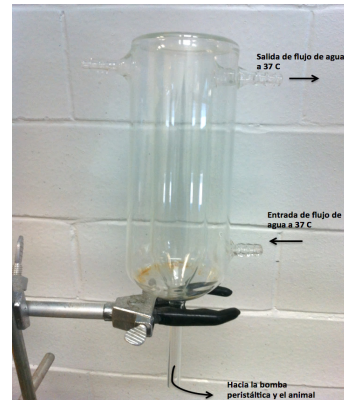


Foto 2. Embudo de doble fondo para perfusión.

Perfusión hepática

1. Se inyecta en el ratón 0.7 mL del anestésico avertina y se deja al animal reposar hasta un completo efecto del anestésico.
2. Se coloca boca arriba en una tabla de disección sujetando patas y manos con cinta adhesiva.
3. Se humedece con etanol al 70% el abdomen y tórax del animal y se procede a realizar una incisión en V partiendo en el centro del abdomen bajo y hacia las axilas del animal. Se levanta primero la piel y luego se repite el procedimiento con el músculo para dejar a la vista las vísceras las cuales se retiran para proceder a cortar el diafragma y caja torácica para dejar a la vista el corazón (Foto 3).

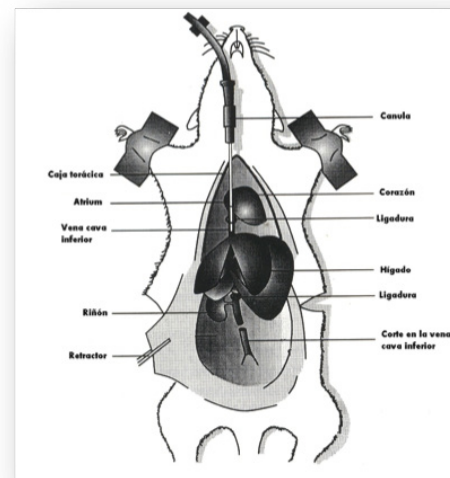


Foto 3. Esquema del animal perfundido.

4. Se hace una incisión pequeña en el atrium del corazón y se introduce suavemente el catéter el cual está unido a la línea que viene del embudo de doble fondo cargado previamente con 25 mL de HBSS a 37 °C. La velocidad debe ser aproximadamente de 1 mL/min. Se corta la vena cava inferior y se liga con suturas. Se corta la vena porta que será el punto de drene. Se hace pasar la solución HBSS y posteriormente se perfunde con la colagenasa.
5. Una vez que ha pasado toda la colagenasa se retira cuidadosamente el hígado colocándose en el tubo cónico donde se preparó la colagenasa y se lleva a la campana de flujo laminar.

6. El hígado se deshace mecánicamente "peinándolo", en una caja Petri de 10 cm, con dos pipetas de 1 mL. Posteriormente se recupera la suspensión con una pipeta de 25 mL y se procede a filtrarlo con el filtro (coladera) de 100 μm .
7. Esta suspensión se centrifuga a 500 rpm (50 g) por 5 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante por aspiración cuidando no tocar el paquete celular.
8. Las células se resuspenden en 25 mL de medio de adhesión y se transfieren a un tubo de 50 mL con 25 mL de solución de percoll, se homogeniza cuidadosamente y se centrifuga a 1000 rpm (200 g) por 10 min a 4°C.
9. El sobrenadante se elimina por aspiración y el paquete celular se lava con 20 mL de medio de adhesión y se centrifuga a 50 g por 5 min a 4°C.
10. El sobrenadante se elimina y se resuspende el paquete celular en 20 mL de medio de adhesión. Se toma una alícuota y se procede a contar las células vivas empleando el colorante de exclusión azul de tripano.
11. Sembrar las células en platos de cultivo de 10 cm a una densidad de 240,000 células/cm², (Fotos 4 y 5).

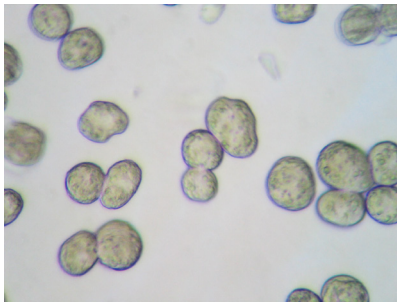


Foto 4. Hepatocitos recién sembrados.

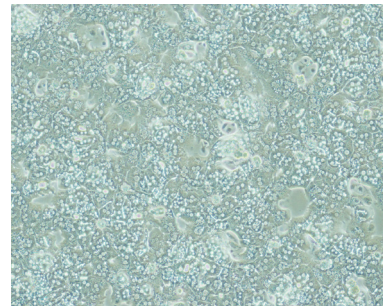


Foto 5. Hepatocitos después de 12 h de cultivo y adheridos en monocapa.

Resultados

Durante 5 días, realizar observaciones utilizando el microscopio invertido cada 24 h y anotar los cambios que se pueden apreciar en cada uno de ellos y de ser posible obtener un registro fotográfico del cultivo.

Día: cero al sembrarse	Día: 1	Día: 2
Día: 3	Día: 4	Día: 5



Análisis de Resultados

Conclusión

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los principales cambios morfológicos de las células en cultivo?
2. ¿Qué características encuentras en términos de núcleos?
3. ¿Qué es el percoll y cuál es la finalidad de su uso en el protocolo de aislamiento de células primarias?
4. En base a los cambios fenotípicos observados, ¿qué recomendaciones daría para usar los cultivos primarios de células animales?

Bibliografía

-  Maurel, Patrick (Ed.). (2010). Hepatocytes. Methods and Protocols. Editorial Humana Press. Philadelphia, USA.
-  Gómez-Quiroz Luis E., Factor Valentina M., Kaposi-Novak Pal, Coulouarn Cedric, Conner Elizabeth A., Thorgeirsson Snorri S. (2008). Hepatocyte specific c-Met Deletion Disrupts Redox Homeostasis and Sensitizes to Fas-mediated Apoptosis. J. Biol Chem. 283 (21):14581-14589.

Cultivo de Células Animales

Se terminó de imprimir en septiembre de 2015,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600