

‘CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA TISULAR’
GRADOS DE BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA
CURSO 2018-19

GUIÓN DE PRÁCTICAS ‘CULTIVOS CELULARES ANIMALES’
RÚBRICA DE EVALUACIÓN

AUTORES:

Ofelia Martínez
Claudia Müller
Manuel Reina
Francesc X. Soriano

Sección de Biología Celular
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Universitat de Barcelona

GUIÓN DE PRÁCTICAS 'CULTIVOS CELULARES ANIMALES'



GUIÓN DE PRÁCTICAS: 'CULTIVOS CELULARES E INGENIERIA TISULAR'

Curso 2018-19

Ofelia Martínez
Claudia Muller
Manuel Reina
Francesc X. Soriano

Departamento de Biología Celular

Profesorado

Manuel Reina, mreina@ub.edu
Claudia Muller, cmuller@ub.edu
Sergi Casellas, scasellas@ub.edu
Alejo Torres, atorrescano@ub.edu

Ofelia Martínez, ofeliarmartinez@ub.edu
Francesc Xavier Soriano f.x.soriano@ub.edu
Marina Ramiro marinaramiro@ub.edu
Juana Fernández juanifernandez@gmail.com

A. Introducción

Las Prácticas de Cultivos Celulares e Ingeniería Tisular 2018-19 tienen como objetivo principal introducir al alumno en los conceptos, técnicas básicas y en la manipulación y en el trabajo diario de un laboratorio de cultivos celulares. Por este motivo, además de las técnicas básicas de descongelación, mantenimiento y manipulación de líneas celulares se han introducido algunos experimentos adicionales de Biología Celular para enfocar la aplicabilidad del manejo de los cultivos.

Las prácticas están organizadas en 5 sesiones consecutivas de 6 horas de duración a lo largo de una semana. Las sesiones se realizarán en el laboratorio p6 del Departamento de Biología Celular (Edificio Anexo, planta -1, Facultad de Biología). Ocasionalmente pueden alargarse más allá del horario previsto.

Se considera que la mayoría de los conceptos que necesitas para hacer estas prácticas se han impartido durante las clases de teoría. No obstante, al inicio de las mismas y cuando sea necesario a lo largo de éstas, el profesorado explicará a todo el grupo los conceptos o detalles del procedimiento que considere necesarios para el correcto desarrollo.

Es muy importante que cuando vengas a las prácticas el primer día hayas leído el guión de prácticas y tengas una clara idea de cómo van a organizarse. Se realizarán preguntas iniciales o finales durante los días de prácticas.

Como sabes las prácticas son obligatorias y es necesario aprobar las prácticas para poder aprobar la asignatura. Se evaluarán por el 20% de la nota final de la asignatura (otro 10% adicional de la nota final corresponderá a la evaluación del bloque de cultivos vegetales):

- Mediante control de asistencia diario. Tendrás que firmar la hoja de asistencia cada día.
- Valoración directa de tu trabajo y de tu evolución por el profesor de prácticas y seguimiento de la libreta de laboratorio que será revisada y calificada.
- Un informe del trabajo realizado que tendrás que entregar mediante el campus virtual 15 días después de finalizar este bloque de prácticas. Se evaluará por el 10% de la nota final. Las instrucciones para la redacción de la memoria se darán a lo largo de las prácticas.

Índice:

| | | |
|-----|---|-------------------------------|
| A. | Introducción..... | 1 |
| A.1 | Medidas de seguridad y gestión de residuos en el laboratorio de cultivos celulares..... | 3 |
| A.2 | Programa de las prácticas | 8 |
| A.3 | Materiales y equipos..... | 9 |
| A.4 | Preparación del material | 10 |
| B. | Tipos celulares empleados y condiciones de cultivo..... | 11 |
| B.1 | Células JURKAT..... | 11 |
| B.2 | Células NRK..... | 12 |
| B.3 | Células HeLa..... | 13 |
| C. | Experimento 1. Manipulación de células adheridas (NRK): congelación/descongelación, contaje y viabilidad de los cultivos..... | 13 |
| C.1 | Manipulación día 1 (LUNES) - Descongelación de una alícuota de células NRK congeladas..... | 14 |
| C.2 | Manipulación 2 (martes)..... | 15 |
| C.3 | Manipulación 3 (miércoles) - Tripsinización de una placa de células adheridas (NRK), subcultivo y elaboración de un stock celular para congelación..... | 15 |
| C.4 | Manipulación 4 (jueves) – Descongelación de la alícuota congelada. | 16 |
| C.4 | Manipulación 5 (viernes) – Observación de placas sembradas..... | 17 |
| D. | Experimento 2. Mantenimiento de cultivos celulares en diferentes condiciones: curvas de crecimiento. 17 | |
| D.1 | Curvas de crecimiento de células en suspensión: células Jurkat..... | 18 |
| D.2 | Curva de crecimiento en células adheridas: células HeLa | 19 |
| E. | Experimento 3: Proliferación de células adherentes NRK: cicatrización de herida (<i>wound healing</i>).. | 21 |
| F. | Experimento 4. Eficiencia de transfección en células Hela..... | 23 |
| G. | ANEXOS..... | 26 |
| D.1 | ANEXO 1: PROCEDIMIENTOS DE CONTAJE | 26 |
| D.1 | ANEXO2:SISTEMAS DE ANALISIS DE IMAGEN | ¡Error! Marcador no definido. |
| D.1 | ANEXO 3: LIBRETA DE LA LABORATORIO | 31 |
| D.1 | ANEXO 4: INFORME DE PRACTICAS..... | 31 |

A.1 Medidas de seguridad y gestión de residuos en el laboratorio de cultivos celulares

Medidas de seguridad en el laboratorio de cultivos celulares

El trabajo de laboratorio se ha de hacer cumpliendo una serie de medidas que garanticen la seguridad individual y colectiva. En última instancia se pretende evitar accidentes y contaminaciones tanto del operario como de los compañeros y del medio ambiente. Las normas que se aplican son las siguientes:

1. Se han de seguir las instrucciones de uso de todos los instrumentos, especialmente de aquellos que suponen o pueden suponer un riesgo para la salud de los operarios o de sus compañeros (cabinas de flujo laminar, incubadores, centrifugas, microscopios...)
2. Se aplican las normas de manipulación microbiológicas estándar: no está permitido comer, beber, o manipular cualquier tipo de alimento en el laboratorio. Antes de salir del laboratorio para comer, beber, etc... es obligatorio lavarse a fondo las manos con agua y jabón. Es altamente recomendable no tocarse la cara ni los labios, no chupar bolígrafos o lápices, etc...
3. Es obligatorio el uso de bata. No se recomienda el uso de guantes desechables.
4. Se recomienda que antes y después de cualquier manipulación con material biológico se laven las manos, observando la presencia de lesiones. Si es el caso, se abstendrá de hacer la manipulación o usará equipos de protección individual adecuados (guantes).
5. Sustancias tóxicas. Algunas de las sustancias que se manipularán (bisbenzimidazoles, azul de tripán, paraformaldehído, etc...) suponen un riesgo químico por su toxicidad o carcinogenicidad por lo que se adoptarán las máximas precauciones en su manejo, no dejando en ningún momento restos contaminados dispersos ni en las poyatas ni en las cabinas de flujo.
6. Cualquier desviación de los procedimientos de seguridad será comunicada al profesor que tomará las medidas necesarias.

Gestión de residuos

En el laboratorio de prácticas se encuentran diferentes recipientes para la recolección de los diferentes tipos de residuos, según su clase y la zona de trabajo:

- **Residuos biológicos:** Habitualmente, serán residuos que provendrán de la cabina de cultivos donde hay unos pequeños recipientes que facilitan su recolección en la cabina (nº 1 en la imagen). Estos recipientes se tienen que vaciar siempre que estén llenos y cada día al acabar las prácticas. Si se trata de sólidos (tubos, puntas, etc...) que han estado en contacto con células se tiran en la bolsa de autoclavado (cubo rojo, nº5 en la imagen), si se trata de líquidos en la garrafa de Biopeligrosos (etiqueta gris, nº 3 en la imagen).
- **Residuos no halogenados** (etiqueta verde, nº4 en la imagen). Alcoholes, colorantes (cristal violeta), etc.
- **Vidrio:** contenedor amarillo (nº 6 en la imagen): portaobjetos, cubreobjetos, SOLO MATERIAL DE VIDRIO etc
- **Plástico:** puntas de pipeta, eppendorfs, Falcon, QUE NO HAYAN TENIDO CONTACTO CON CÉLULAS etc
- **Paraformaldehído:** habrá un recipiente para sólidos y otro para líquidos en la cabina de extracción de gases
- **Material citotóxico,** como por ejemplo Hoescht o DAPI. Separar líquidos y sólidos en recipientes específicos (nº7 en la imagen)

Cualquier otro residuo preguntar al profesor.

¿Qué hago con...

- Puntas usadas en poyata? → Contenedor de plástico (SI NO HAN TENIDO CONTACTO CON CELULAS, SI LO HAN TENIDO → BOLSA DE AUTOCLAVE)
- Puntas usadas en cabina de flujo (contacto con medio y células)? Bolsa de autoclavado

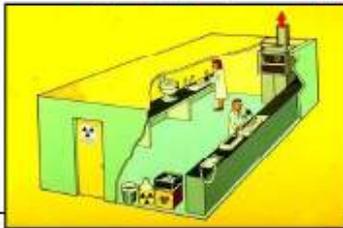
- Bote de residuos líquidos usados en poyata (nº2 en la imagen, no aldehídos no fijadores)? Si han tenido contacto con células → Líquidos biopeligrosos; si no han tenido contacto con células →Residuos no halogenados
- Bote de residuos líquidos usados en cabina de flujo? Garrafa de Residuos Biopeligrosos
- Cajas de puntas vacías (de poyata o de cabina), botes de eppendorf, botes de cubreobjetos? Los has de rellenar en la poyata del fondo donde encontrarás el material de plástico necesario y el rollo de cinta de autoclavar. En caso de que necesites algo pídelo al profesor.
- Cubreobjetos usados en cámara de Neubauer? En contenedor de vidrio. No se lavan.
- Placas con células? Recoger el líquido en garrafa biopeligrosos y tirar las placas en Bolsa de autoclavado.
- Papel y restos varios? Si están limpios a las papeleras grandes negras, si está sucio (restos biológicos) en la bolsa de autoclavado.

A continuación se describen algunos de los riesgos más comunes de trabajar en los laboratorios 22 y 28 (BSL1) y las medidas de precaución que se han de respetar rigurosamente.



Prácticas de Laboratorio / Procedimiento Microbiológico Estándard

1. Signo de riesgo biológico en el exterior
2. **Prohibido beber, fumar, comer,...** El alimento se guarda en neveras separadas
3. Recomendada **bata** para la protección de la ropa de calle
4. **Prohibido pipetear con la boca**
5. Cuidado con los **objetos punzantes**, recogerlos en Chemo-Box
6. **Reducción de aerosoles** y salpicaduras
7. **Descontaminación** de la superficie de trabajo después del trabajo y de un accidente
8. **Autoclavado** del material antes de su descarte / eliminación.
9. **Lavado de manos** antes de salir y siempre que sea necesario



Elementos de riesgo en LSB-1:

1. Uso de mecheros bunsen
2. Agujas y material cortante
3. Pipetas
4. Uso de centrifugas
5. Rellenado y vaciado de tubos (aerosoles)

Cultivos e Ingeniería Tisular 10-11

Elementos de riesgo en uso de LSB-1 : uso de pipetas

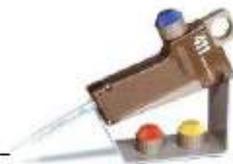
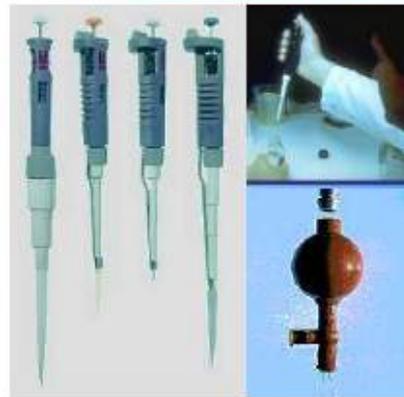
Pipetas : utilizarlas adecuadamente

1. Prohibido pipetear con la boca (ingestión oral)
2. **Evitar salpicaduras** : comprobar correcto funcionamiento para evitar goteo, uso de pipetas de doble enrase y de hojas de papel absorbente
3. Evitar aerosoles : no expulsar violentamente los líquidos y no usar las pipetas para mezclar soluciones



Después de su uso :

- Eliminarlas en contenedores de paredes duras o Chemo-Box
- Pipetas de cristal o reutilizables : sumergirlas en lejía (1/10), lavar y esterilizar
- Micropipetas o 'peras de goma' : protegerlas con filtros
- Elegir dentro de lo posible micropipetas esterilizables
- Descontaminar, limpiar y calibrar periódicamente las micropipetas : externamente y el cilindro de entrada con alcohol étílico



Cultivos e Ingeniería Tisular 10-11

Elementos de riesgo en uso de LSB-1 : uso de centrifugas

Riesgos asociados al uso de centrifugas :

1. Riesgo de daño mecánico
2. Riesgo por operación incorrecta : mal equilibrado de tubos, rotor mal fijado, tubo rotos
3. Generación de aerosoles (cámara de centrifuga sucia o llena de líquidos de condensación)

Selección de tubos para uso en centrifugas

1. Tubos irrompibles, que se han de revisar antes de usar
2. Conocer las propiedades antes de usar (polipropileno-policarbonato, esterilizables,...) descartando los tubos frágiles o de materiales peligrosos como los de nitrato de celulosa que son inflamables y estallan bajo presión
3. Usar los adaptadores adecuados para cada tipo de tubo
4. En el caso de agentes biológicos de riesgo las cestillas del rotor han de ser estancas así como la cámara de la centrifuga.



ultiv

.1

Elementos de riesgo en uso de LSB-1 : rellenado y vaciado de tubos

Rellenado de los tubos :

- Llenado de tubos en la cabina de seguridad biológica
- Descontaminación de la superficie externa con desinfectante
- Se puede poner un poco de desinfectante en el fondo del agujero del rotor

Vaciado de tubos :

- Eliminar el sobrenadante mediante aspiración por vacío y uso de trampas (protegido)
- Resuspensión de precipitados por sistemas rotatorios (no violentos)
- Antes de abris un tubo esperar en reposo de 1 a 2 minutos.

Todos los procesos que generan aerosoles se pueden realizar en el interior de la Cabina de Seguridad Biológica, incluso las microcentrifugas se pueden colocar en el interior de la cabina.

Otros procedimientos que pueden formar aerosoles :

- agitación con vórtex (siempre con tubos cerrados)
- apertura de tubos (procurar no mojar los tapones, esperar a que sedimente el medio líquido, abrir con papel absorbente mojado en desinfectante, trabajar en cabina de seguridad biológica,...)
- rotura de células mediante ultrasonidos, desintegración mecánica, prensa de French... : trabajo en cabina de seguridad biológica y descontaminación del aparato después de su uso.



Cu

A.2 Programa de las prácticas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Células | Material | |
|------------------------------|---|--|-------------------------------|---|---|-------------------------------------|---------------|---|
| Preparación material | Puntas, eppendorf, cubres, medios organización nevera | | | | | | | |
| Manipulación/ Descongelación | Células adherentes | Descongelación, viabilidad, siembra. Fotografiar spreading | Fotografiar crecimiento | a)Tripsinizar, congelación y b) resiembra | a)Descongelación, viabilidad,siembra b) crecimiento | a) y b) resultado | NRK | Placa 35mm, 1/persona |
| Crecimiento | Células en suspensión y adherentes | Descongelación, viabilidad, siembra. | Contaje. Cambio de medio Hela | Contaje. Fotografía. Cambio de medio Jurkat | Contaje. Fotografía | Fotografía. Fotografía. Resultados | Jurkat y Hela | Placa 6 pocillos (1 por grupo y tipo celular) |
| Herida (Wound healing) | Células adherentes | Siembra | Observación. Fotografía | Heerida. Fotografía. Cambio de medio | Fotografía | Fotografía. Resultados | NRK | Placas 35mm (2 por grupo) |
| Modificación celular | Células adherentes | Siembra | Transfección | Observación. Cambio de medio a Optimen | Fijación y montaje | Observación .Fotografía. Resultados | HELA | Placa de 24 pocillos, 6 cubres / placa |

Además de lo indicado en la tabla del programa de prácticas y en el índice del guión, está previsto que los alumnos realicen una visita a las instalaciones de criogenia de la Facultad de Biología y al laboratorio de Celltec UB. Esta visita se hará por grupos y se adaptará a los días y momentos de menor carga de trabajo en el laboratorio. La planificación de las mismas se comunicará al principio de la sesión.

A.3 Materiales y equipos

Material que ha de traer el alumno

1. Bata (obligatorio)
2. Manual de prácticas impreso (obligatorio)
3. Libreta de laboratorio
4. Rotulador de vidrio de punta fina
5. Cámara fotográfica (sirve la cámara del teléfono móvil)
6. Pen-drive USB para grabar resultados

Material que el alumno encontrará en la poyata (por grupo de 5 alumnos)

Juego de pipetas Gilson : P20, P200, P1000
Gradillas de eppendorf y de tubo de 15 ml
Caja de puntas azules y amarillas
Contenedor para recogida de puntas usadas, tupos eppendorf, etc...
Contenedor para recogida de líquidos
Cámara Neubauer para el conteo (4)
Portaobjetos y cubreobjetos

Material que el alumno encontrará en el interior de la cabina de flujo laminar (y que no puede sacar)

Juego de pipetas Gilson : P20, P200, P1000
Gradillas de eppendorf y de tubo de 50 ml
Caja de puntas azules y amarillas
Contenedor para recogida de puntas usadas, tupos eppendorf, etc...
Contenedor para recogida de líquidos

Equipos necesarios situados en el laboratorio 22

Cabina de Seguridad Biológica Tipo I (1)
Cabina de Seguridad Biológica Tipo IIA (1)
Incubador de CO₂ (1)
Estufa de 37°C (no confundir con el incubador de CO₂ (1)
Baño de agua (1)
Centrífugas para Eppendorf (1)
Microscopios de luz transmitida verticales Olympus CH (12)
Microscopio invertido de contraste de fases Nikon TMS-F (1)
Microscopio invertido de contraste de fases Optika equipado con cámara y sistema de captación de imágenes (1)
Microscopio de fluorescencia Olympus BX41 TF equipado con cámara fotográfica (1)
Nevera – Congelador (1)

Equipos necesarios situados en el laboratorio 28

Sala de cultivos

Cabinas de Seguridad Biológica Tipo IIA (2)
Incubador de CO₂ (1)
Centrífuga para tubos de 15 y 50 ml (1)
Centrífuga para eppendorf (1)
Baño de agua (1)
Microscopio invertido de contraste de fases Nikon TMS-F

Precámara

Nevera y congelador
Microscopio invertido de contraste de fases Optika equipado con cámara y sistema de captación de imágenes.

Microscopio de fluorescencia Leica DMLB equipado con cámara y sistema de captación de imágenes.

Material fungible y otro material

Los alumnos se organizarán en grupos de trabajos formados por 5 alumnos. Cada uno de los equipos de trabajo tendrá un material propio asignado:

- Una poyata (desde la número 1 situada en la poyata más próxima a las cabinas de flujo en el lab 22 a la número 4 situada en la poyata más alejada)
- Una cabina de flujo laminar (el grupo 1 usará la cabina de clase II horizontal (roja), el grupo 2 la cabina Biolla, el grupo 3 la cabina del fondo del lab 28 y el grupo 4 la cabina de la entrada del lab 28), con todo el material de su interior que no se puede sacar de la cabina.
- 2 microscopios directos de campo claro
- 1 juego de pipetas : P20, P200, P1000
- Cajas de puntas, contenedores para residuos, etc...
- Un espacio en la nevera de 4°C en la que colocar sus reactivos.
- Un espacio en incubador de CO₂ en el que colocar sus cultivos. El incubador que se usa por los alumnos en las prácticas es el instalado en el laboratorio 22. El del laboratorio 28 es de uso por los profesores.

Todo el material necesario, incluso los reactivos congelados, tubos de cualquier tipo o pipetas largas o cajas de puntas estériles serán entregados por el profesor a petición del alumno en su nombre o en el del grupo.

Una vez entregados los reactivos cada grupo será responsable de su adecuada conservación (temperatura ambiente, 4°C, congelación, oscuridad/luz, etc...) hasta que sea necesario su uso. Todos los contenedores de cultivo, tubos de reactivos, etc.. han de estar correctamente rotulados. Los tubos no rotulados serán recogidos y eliminados.

Diariamente se revisarán las poyatas, cabinas e incubador y se avisará a los alumnos que no sigan las normas.

Cuando acaba la sesión todo el material ha de quedar correctamente recogido en el lugar adecuado, la poyata despejada, los residuos eliminados de manera conveniente y los microscopios tapados con su funda.

A.4 Preparación del material

Esterilización del material

El primer día de prácticas los grupos contarán con el material estéril necesario. Cada uno de los grupos utilizará el que precise pero ha de ser consciente que se ha de ir reponiendo.

A lo largo de las prácticas se consume una cantidad importante de material desechable, especialmente puntas de pipeta, pero también tubos eppendorf. Para asegurar el correcto reemplazamiento del mismo cada grupo, a medida que vacíe cajas de puntas, etc.. las rellenará con nuevo material que encontrará en la poyata del fondo del laboratorio (al lado de las ventanas) donde dejará la caja rellena y cerrada con cinta de autoclavado.

Medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo. Los medios de cultivo son soluciones con multitud de componentes que habitualmente se adquieren a empresas que los producen y suministran. En estas prácticas vamos a utilizar tres diferentes medios de cultivo : DMEM 1g/L, DMEM 4,5g/L y RPM1640. Los medios de cultivo que emplea cada una de las líneas celulares son:

| Línea celular | Medio de cultivo |
|---------------|---------------------|
| NRK | DMEM 4,5g/l glucosa |
| Hela | DMEM 1g/l glucosa |
| Jurkat | RPMI-1640 |

Las soluciones comerciales que es lo que os suministraremos y que se almacenan a 4°C se tienen que suplementar con:

- **Antibióticos.** Emplearemos una solución de penicilina y estreptomina a una concentración final respectivamente de 50 U/mL y 50 µg/mL. La solución concentrada de antibióticos contiene penicilina y estreptomina a una concentración 100x respecto a la de uso: 5000 U/mL penicilina y 5000 µg/mL estreptomina. Está congelada a -20°C y se ha de atemperar a 37°C antes de usar.
- **Glutamina,** que en el medio de cultivo está a una concentración de 2 mM. La solución de glutamina concentrada tiene una concentración de 200 mM (100x). Está congelada a -20°C y se ha de atemperar a 37°C antes de usar. Asegurarse que la glutamina está completamente disuelta pues suele precipitar al congelar.
- **Suero Bovino Fetal (FBS).** En los medios se suele usar a una concentración del 10% final. El tubo que te entregaremos está al 100%. Ten cuidado al preparar los medios de los experimentos 2 y 3 en los que precisamente no hay suero en el medio o se ponen diferentes concentraciones del mismo.

La mayor parte de los cultivos que manipularás en estas prácticas se utilizarán en contenedores de cultivo de 35 mm de diámetro (placas Petri o T6) en las que el volumen de medio a usar será de 1,5 mL salvo que se indique expresamente lo contrario (por ej. Experimento 2, células JURKAT).

Otras soluciones de trabajo que estarán preparadas:

PBS 100 mM : 100 mM fosfato Na/K, 159 mM NaCl, pH 7,4
TBS 25 mM Tris pH 7,4 en NaCl/KCl 140 mM
Azul tripán al 0.4% en PBS
Cristal Violeta
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Soluciones stock experimentos 4 y 5
Paraformaldehído al 16% (sol. Stock)
Sacarosa 1 M
PB 0.2 M
Medio de montaje para fluorescencia "Fluoromount"
Hoescht

B. Tipos celulares empleados y condiciones de cultivo

B.1 Células JURKAT.

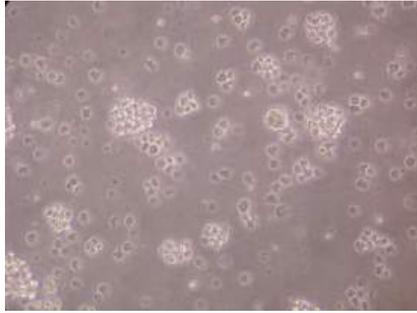
La línea JURKAT (originalmente denominada JM) es una línea celular inmortalizada de linfocitos T que fue establecida a finales de los 70 a partir de la sangre periférica de un joven de 14 años que padecía leucemia de células T. Se han establecido a partir de entonces diferentes líneas celulares derivadas mutadas en diferentes genes y que se encuentran disponibles en los bancos de células. Su primera utilidad fue la evaluación de la susceptibilidad de tumores a determinados fármacos y a la radiación. Se ha utilizado fundamentalmente por su propiedad de sintetizar interleuquina 2.

Se trata de una línea celular que crece en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con 10%FBS, alcanzando densidades de cultivo de 1 a 2×10^6 cel/mL.

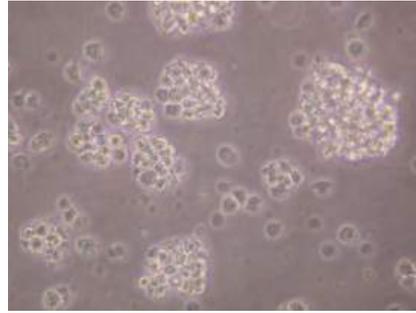
Especie de origen: humana (blanco, caucásico)
Tejido de origen: sangre periférica de individuo leucémico (14 años)
Nivel de bioseguridad: 1
Medio de cultivo: RPMI1640 + 10% FBS, crecimiento en suspensión
Condiciones de cultivo: 95% aire, 5% CO₂
Densidad de cultivo: mantener entre 100.000 y 1.000.000 cel/mL
Renovación de medio: por dilución del cultivo cada 2-3 días
Preservación: densidad media 500.000 a 1.000.000 cel/mL en medio de cultivo y 5%DMSO
Temperatura de almacenamiento: fase gaseosa de nitrógeno líquido

Wikipedia : http://en.wikipedia.org/wiki/Jurkat_cells

ATCC:

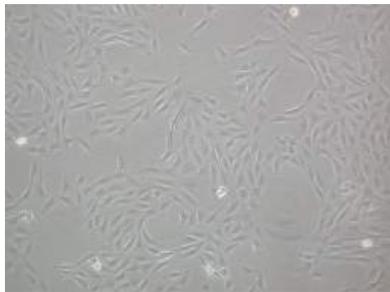


Células JURKAT en cultivo observadas con un microscopio de contraste de fases (a 100x y 200x)



B.2 Células NRK

La línea celular NRK (*Normal Rat Kidney Fibroblast*) fue derivada de riñón de rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Osborne-mendel. Se trata de un cultivo adherente que presenta una morfología epitelial: células extendidas con un citoplasma aplanado y una región nuclear central (ver imagen).



Células NRK en cultivo observadas con un microscopio de contraste de fases (a 100x y 200x)

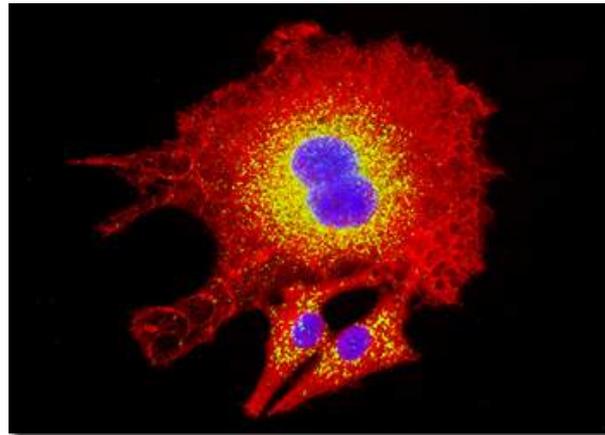


Imagen de inmunofluorescencia de células NRK en las que se detecta clatrina (Texas Red), PMP-70 (proteína peroxisomal, Alexa Fluor 668, verde), y tinción nuclear con Hoechst 33342. De Olympus Fluorescence Digital Library.

(<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/nrk/nrkcellslarge.html>)

Se trata de una línea celular que crece en adhesión a un soporte de cultivo en medio DMEM suplementado con 10% FCS. La tasa de división es de 1:4 a 1:12, con una frecuencia de renovación de medio de 2 a 3 días

Especie de origen: *Rattus norvegicus*, cepa: osborne-mendel

Tejido de origen: epitelial, riñón

Nivel de bioseguridad: 1

Medio de cultivo: DMEM 4,5 g/L glucosa + 10% FBS

Condiciones de cultivo: 95% aire, 5% CO₂, 37°C

Subcultivo: tripsina (0,25%) + EDTA (0,53 mM)

Relación de división: 1:4 a 1:12

Cambio de medio: cada 2 a 3 días

Medio de congelación: medio de cultivo 95%, DMSO 5%

Temperatura de almacenamiento: fase vapor de nitrógeno líquido

NRK cells in Olympus:

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/nrk/nrkcells.html>

NRK cells in ATCC:

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-6509>

B.3 Células HeLa

Es una línea celular epitelial establecida a partir de un carcinoma de cérvix humano y la primera línea celular permanente de origen humano. Sus siglas provienen de las iniciales de *Henrietta Lacks*, la mujer de 31 años de la cual se obtuvieron las células HeLa en 1951.

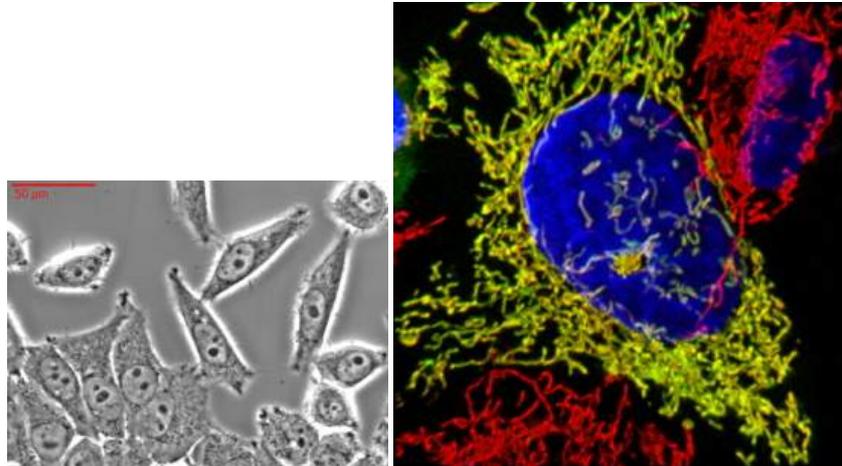


Imagen de microscopía de contraste de fases de células HeLa (izquierda). Derecha, fotografía de fluorescencia de células HeLa marcadas con Mitotracker red (rojo), Hoescht (azul) y transfectadas con EGFP-FLJ10618 (un transportador localizado en la mitocondria). *Cross Cancer Institute & University of Alberta* y http://www.advanced-imaging-center.org/aic_partnerView.cfm?KeyID=45.

Especie de origen: humano (negro, afro-americano)

Tejido de origen: carcinoma de cervix

Nivel de bioseguridad: 1

Medio de cultivo: DMEM 1 g/L glucosa + 10% FBS

Condiciones de cultivo: 95% aire, 5% CO₂, 37°C

Subcultivo: tripsina (0,25%) + EDTA (0,53 mM)

Relación de división: 1:4 a 1:6

Cambio de medio: cada 2 a 3 días

Medio de congelación: medio de cultivo 95%, DMSO 5%

Temperatura de almacenamiento: fase vapor de nitrógeno líquido

Wikipedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/HeLa>

ATCC: <http://www.lgcpromochem-tcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-153>

C. Experimento 1. Manipulación de células adheridas (NRK): congelación/descongelación, conteo y viabilidad de los cultivos

Antes de empezar la manipulación localiza en el laboratorio:

- la cabina de flujo laminar que corresponde a tu grupo, aprende a encenderla y a comprobar su correcto funcionamiento.

- el incubador de CO₂, localiza el espacio que has de usar. Comprueba las condiciones de ajuste del mismo (T^a, % CO₂)
- el espacio de almacenamiento en nevera
- la poyata de trabajo, con todo el material que ha de contener

Esta práctica se ha de realizar individualmente aunque se propone que la preparación de los 10 mL de medio que precisan los 5 miembros del grupo se prepare conjuntamente. El resto de los procesos es importante que los haga individualmente cada uno de los miembros del equipo.

El objetivo de la práctica es aprender a manipular un cultivo de células adheridas. Para ello cada alumno deberá:

- El día 1 (lunes) descongelar una alícuota de células NRK y sembrarla en una placa (p1) de 35 mm de diámetro. Incubar. Determinar el número de células sembradas y su viabilidad. Toma de fotografías y seguimiento del proceso de 'spreading' (imágenes a los 45 min, y a las 2 h).
- El día 2 (martes) observación del cultivo y toma de imágenes de registro.
- El día 3 (miércoles) tripsinización del cultivo y siembra de la mitad del volumen en una nueva placa (p2) de 35 mm de diámetro (replaqueo) y congelación de la otra mitad. Determinación del número de células y de la viabilidad. Toma de fotografías de registro y posible seguimiento de 'spreading'.
- El día 4 (jueves) toma de fotografías de registro de la placa y descongelación de la alícuota congelada, siembra en placa (p3) de 35 mm de diámetro. Toma de fotografías de registro.
- El día 5 (viernes) toma de fotografías de registro. Eliminación del cultivo.

C.1 Manipulación día 1 (LUNES) - Descongelación de una alícuota de células NRK congeladas.

Material necesario:

- 1 alícuota de células NRK (1,5 X 10⁵ células/vial) – 500 ul (caja de nieve carbónica, pedir al profesor)
- 1 placa de Petri de 35 mm de diámetro (en cabina de flujo)
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C (DMEM Gln P/S 10% FCS) (a preparar por el grupo)
- Cabina de flujo laminar (la que corresponda al grupo, limpia, encendida y con el material estéril necesario)
- Azul Tripán (1 alícuota) (pedir al profesor)
- Cámara de contaje celular
- Microscopio óptico, luz transmitida (puede ser directo o invertido).

Procedimiento:

Toda la manipulación se ha de realizar en el interior de la cabina de flujo laminar, con material estéril. Todo el material en contacto con las células se ha de eliminar en los residuos biológicos que se autoclavarán al terminar la sesión. Es muy importante de que te asegures que tienes todo el material y los reactivos necesarios, y que has preparado los medios que vas a necesitar antes de coger las células congeladas.

1. Localiza la cabina de flujo laminar, comprueba su funcionamiento y que contenga el material (tubos, placas, pipetas, puntas, medio de cultivo ..) que has de utilizar. Despeja el área de trabajo. Recuerda que has de intentar trabajar tan adentro de la cabina como te sea posible.
2. Asegúrate de tener un baño atemperado a 37°C listo. Atempera el medio comercial, la solución de glutamina, la de antibiótico y el suero.
3. Prepara el medio que necesitas: complementa un tubo de 15 mL de DMEM 4,5 g/L (comercial) con Glutamina (100%), antibióticos (100x) y FCS (100%) (Este volumen de medio será suficiente para los cinco miembros del grupo).
4. Localiza las alícuotas de células NRK. Éstas han estado almacenadas en nitrógeno líquido y han sido transportadas al laboratorio en nieve carbónica. Las pides al profesor.

Procedimiento de descongelación de una alícuota celular

1. Descongela la alícuota de células NRK en un baño de agua a 37°C hasta que esté casi descongelado (ha de verse aún algo de hielo en la solución) (de 30 seg a 1 min). Inmediatamente seca el tubo y llévalo a la cabina de flujo laminar.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.

3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave (cerrar el tubo e invertir o pipetear arriba-abajo suavemente sin que se forme espuma).
 4. Se centrifuga durante 4 min a 1000 rpm (600 – 700 xg) (centrífuga para tubo eppendorf). Poner el tubo de forma que se pueda reconocer en que parte del fondo se formará el sedimento.
 5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación en el contenedor de líquidos. Si se extrae con la pipeta es importante que no se acerque en ningún momento a la zona de la base del tubo en la que se encuentra el sedimento.
 6. Se resuspende el sedimento celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
 7. Tomar 20 ul y ponerlos en un tubo eppendorf para proceder a contaje y determinación de viabilidad (anexo 1)
 8. Se transfiere la suspensión celular (1 ml) a una placa de Petri de 35 mm de diámetro.
 9. Se añade 0,5 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril.
 10. Se homogeniza la suspensión celular de la placa de Petri con movimientos en forma de cruz con la finalidad de obtener una *siembra celular regular* (IMPORTANTE).
 11. Observa la placa en el microscopio. Fíjate en el aspecto que tienen las células. Toma una imagen en el microscopio.
 12. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).
5. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina.
 6. A los 30-45 min y a las 2-3 h comprobar el estado de adhesión de las células. En cultivos NRK se observa 'spreading' a partir de los 30 min de la siembra. Fíjate en el aspecto que tienen las células. Toma una imagen.

C.2 Manipulación 2 (martes)

Observación del cultivo de células NRK: registro fotográfico.

C.3 Manipulación 3 (miércoles) - Tripsinización de una placa de células adheridas (NRK), subcultivo y elaboración de un stock celular para congelación

Materiales necesarios:

- Placa de Petri (35 mm) con células NRK que has preparado en el punto C1
- PBS 100 mM sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ atemperado a 37°C (pedir al profesor)
- Solución de Tripsina- EDTA atemperada a 37°C (pedir al profesor)
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C (preparado por el grupo)
- Azul tripano (reactivo del grupo (lunes))
- Cámara de contaje celular
- Microscopio óptico, luz transmitida
- Solución de Congelación (50% Suero Bovino Fetal + 40% medio de cultivo celular + 10% Dimetil Sulfoxido - DMSO; vol:vol:vol) (a preparar por el grupo)

Procedimiento

Toda la manipulación se ha de realizar en el interior de la cabina de flujo laminar, con material estéril. Todo el material en contacto con las células se ha de eliminar en los residuos biológicos que se autoclavarán al terminar la sesión. Es muy importante de que te asegures que tienes todo el material y los reactivos necesarios, y que has preparado los medios que vas a necesitar antes de coger las células.

1. Asegúrate que dispones de todo el material (tubos, placas, pipetas, puntas, ...) y reactivos, medio de cultivo, solución de tripsina+EDTA, PBS 100 mM,..) que has de utilizar. Despeja el área de trabajo.
 - a. Medio de cultivo : DMEM 4,5 g/L P/S 1x L-Gln 1x 10% FBS (15 mL por grupo de alumnos)
 - b. Solución de congelación (50% FBS, 40% medio completo, 10% DMSO) (1,5 mL por grupo)
2. Atempera la solución de tripsina-EDTA en un baño de agua a 37°C. Es muy importante que la tripsina esté a 37°C para que sea plenamente efectiva en la desadhesión celular (¡es una enzima!).
3. Observa la *morfología fibroblástica* de las células NRK en cultivo (placa de Petri de 35 mm) mediante microscopía de contraste de fases. Toma una imagen.
4. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad aspira el medio de cultivo de la placa con la ayuda de una punta azul estéril.

5. Lava el cultivo celular rápidamente con 1 ml de PBS 0,1 M estéril con la ayuda de una punta azul estéril (dos veces, X2). Es importante que aspire totalmente el PBS, dejando la placa completamente escurrida. Ayúdate inclinando la placa. Has de tener mucho cuidado en no apoyar la punta de la pipeta nunca sobre la monocapa celular. Cuando añadas solución hazlo sobre la pared de la placa, nunca directamente sobre la monocapa celular.
6. Añade toda la solución de tripsina-EDTA (unos 400ul) atemperada a 37°.
7. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C) de 3 a 5 minutos. Comprueba que las células se han retraído y tienen una forma redondeada (microscopía de contraste de fases). En caso contrario incuba un tiempo más largo. No conviene incubar las células mucho tiempo con tripsina pues se reduce la viabilidad de las células.
8. Observa la *morfología redondeada* de las células mediante microscopía de contraste de fases..
9. En la cabina de flujo laminar, se inactiva la acción de la tripsina añadiendo 1 ml del medio de cultivo atemperado a 37°C (contiene un 10% de FCS). Toma una imagen.
10. Lava la superficie de la placa. Para ello se realizan maniobras sucesivas de aspiración-expulsión del medio de cultivo, a fin de que se origine un discreto flujo de arrastre (maniobra de “lavado”) sobre la superficie de la placa con el objeto de despegar las células. Se recomienda la utilización de puntas azules estériles y pipeta automática. Se intenta evitar la formación de espuma en la maniobra.
11. Recoge la suspensión celular en un eppendorf estéril (volumen total = 1,4 ml).
12. Se centrifuga durante 4 min a 1000 rpm (600 – 700 g). Posiciona el tubo con el ‘rabillo’ hacia fuera.
13. Mientras esperas que termine la centrifuga comprueba observando la placa al microscopio que realmente has recogido la mayoría de las células de la placa. Toma una imagen
14. aspira el sobrenadante con una pipeta P1000 con cuidado de no arrastrar el sedimento.
15. Añade 1 mL de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves o mediante movimientos suaves de inversión (IMPORTANTE).
16. Siembra 0,5 mL de la suspensión celular en una placa de 35 mm de diámetro. Añade 1mL de medio completo atemperado.
17. De los 0.5mL restantes, toma 20 uL y úsalos para determinar el número de células y la viabilidad (anexo1). Antes de empezar el proceso de contaje, acaba el punto 18.
18. Con el resto prepara una alícuota stock.

Preparación de una alícuota stock de células para su congelación.

19. Centrifuga durante 4 min a 1000 rpm (600 – 700 g).
20. En la cabina de flujo laminar, descarta el sobrenadante por aspiración con P1000.
21. Resuspende el sedimento celular con 250 µl de la solución de congelación mediante la utilización de una pipeta automática con punta azul estéril.
22. Homogeniza la suspensión celular. Etiqueta claramente el tubo (num grupo, iniciales).
23. Congela progresivamente a -20°C durante 3 a 6 horas (cajón 2 del congelador en una gradilla de poliestireno expandido). El profesor se ocupará de pasarla a -80°C.
24. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

Alternativamente se puede congelar el tubo empleando un equipo de congelación programada como el que has podido observar en el servicio de criogenia de la Facultad. La finalidad sería poder llegar a congelar en Nitrógeno líquido a -196°C, pero por necesidades de procedimiento y problemas de horario el alumno sólo podrá llegar hasta el nivel de congelación indicado en el paso 23.

C.4 Manipulación 4 (jueves) – Descongelación de la alícuota congelada.

Materiales necesarios:

- Placa de Petri (35 mm) con células NRK
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C (preparado por el grupo)
- Azul tripano (reactivo del grupo (lunes))
- Cámara de contaje celular
- Microscopio óptico, luz transmitida

Procedimiento

Toda la manipulación se ha de realizar en el interior de la cabina de flujo laminar, con material estéril. Todo el material en contacto con las células se ha de eliminar en los residuos biológicos que se autoclavarán al

terminar la sesión. Es muy importante de que te asegures que tienes todo el material y los reactivos necesarios, y que has preparado los medios que vas a necesitar antes de coger las células congeladas.

1. Las alícuotas de células congeladas estarán en el laboratorio (congelador de -20°C). Pregunta al profesor. Has de seguir el procedimiento que aplicaste el primer día :

Procedimiento de descongelación de una alícuota celular

1. Descongela la alícuota de células NRK en un baño de agua a 37°C hasta que esté casi descongelado (ha de verse aún algo de hielo en la solución) (de 30 seg a 1 min). Inmediatamente seca el tubo y llévalo a la cabina de flujo laminar.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.
3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave (cerrar el tubo e invertir o pipetear arriba-abajo suavemente sin que se forme espuma).
4. Se centrifuga durante 4 min a 1000 rpm (600 – 700 xg) (centrífuga para tubo eppendorf). Poner el tubo de forma que se pueda reconocer en que parte del fondo se formará el sedimento.
5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación en el contenedor de líquidos. Si se extrae con la pipeta es importante que no se acerque en ningún momento a la zona de la base del tubo en la que se encuentra el sedimento.
6. Se resuspende el sedimento celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
7. Tomar 20 ul y ponerlos en un tubo eppendorf para proceder a contaje y determinación de viabilidad (anexo 1)
8. Se transfiere la suspensión celular (1 ml) a una placa de Petri de 35 mm de diámetro.
9. Se añade 0,5 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril.
10. Se homogeniza la suspensión celular de la placa de Petri con movimientos en forma de cruz con la finalidad de obtener una *siembra celular regular* (IMPORTANTE).
11. Observa la placa en el microscopio. Fíjate en el aspecto que tienen las células.
12. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).

Al finalizar cualquier proceso:

Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

C.4 Manipulación 5 (viernes) – Observación de placas sembradas.

Observación del cultivo de células NRK: registro fotográfico.

Cuando termines el cultivo has de eliminarlo con lejía y descartar la solución y el plástico de manera adecuada.

D. Experimento 2. Mantenimiento de cultivos celulares en diferentes condiciones: curvas de crecimiento.

Objetivos:

- conocer y aplicar procedimientos básicos de manipulación de células en el laboratorio de cultivo, con especial énfasis en la aplicación de procedimientos de técnica aséptica que preserven la esterilidad del cultivo así como la seguridad del operario y de sus compañeros.
- Contar y aprender a distribuir/sembrar las células para ensayar diferentes condiciones de experimentación. Utilizar factores de dilución.
- Manejar diferentes medios de cultivo en un mismo proceso de siembra y crecimiento.

Planificación: este experimento se inicia el día 1 (lunes) y termina el día 5 (viernes).

Observación: el cultivo de células Jurkat (suspensión) se hará en una placa multipocillos de 6 en el que cada pocillo tiene un diámetro de 35 mm. Sin embargo solo en este caso haremos el cultivo con un volumen de medio de 2 mL. La razón es que cada día hemos de tomar de 80 a 100 ul de medio para el contaje de las células. Usando 2 mL nos aseguramos de disponer de medio suficiente.

D.1 Curvas de crecimiento de células en suspensión: células Jurkat

En este experimento crecerás células Jurkat que habrás sembrado en diferentes condiciones (concentraciones de suero). El objetivo es poder observar si se ve afectado el crecimiento de las poblaciones celulares por la concentración de suero en el medio. Para ello sembraremos el mismo número de células en cada pocillo y, cada día, mediremos el número de células que contiene. Para poder tener una estimación más precisa, cada día se realizarán 5 contajes de cada pocillo: 1 por cada persona del grupo.

El experimento se realizará en una placa de 6 pocillos por grupo siguiendo el siguiente esquema:

| | | |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| RPMI-1640 | RPMI-1640 + 0.5% FBS | RPMI-1640 + 1% FBS |
| RPMI-1640 + 2.5% FBS | RPMI-1640 + 5% FBS | RPMI-1640 + 10% FBS |

Material necesario:

- 1 alícuota de células JURKAT en crecimiento (pedir al profesor)
- 1 placa de de cultivo de 6 pocillos (pedir al profesor)
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C (RPMI P/S L-Gln 0; 1; 2; 5; 10 y 20% de FBS)
- 1 tubo estéril de 15 ml, viales eppendorfs estériles
- Azul tripano
- Cámara de contaje celular
- Microscopio óptico, contraste de fases

Día 1 (lunes): siembra del cultivo de células JURKAT

1. En este experimento utilizarás diferentes medios de cultivo; asegura que tienes preparados todos los que necesitas:
 - a. 6,5 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 0% suero
 - b. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 0% suero
 - c. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 1,0% FBS
 - d. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 2,0% FBS
 - e. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 5,0% FBS
 - f. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 10,0% FBS
 - g. 1,2 mL de RPMI1640, 1x Glu, 1x P/S, 20,0% FBS

Nota: para preparar los medios que necesitas es recomendable preparar una solución de RPMI1640 con antibióticos y L-Gln (RPMI1640 completo) pero sin suero. Sobre esta solución puedes ir añadiendo la cantidad de suero necesaria. Puedes hacer las soluciones finales de 1,2 mL en tubos eppendorf.

2. El profesor te entregará una alícuota de células Jurkat con una concentración celular y viabilidad conocida.
3. Has de sembrar 200.000 células por pocillo, por lo que pondrás el volumen que contenga las células necesarias para 6,5 pocillos (tienes que calcularlo) en un tubo de 15 mL que centrifugarás a 1000 rpm (600-700 xg) 4 min. Eliminarás el medio por decantación en la cabina de flujo laminar evitando perder el sedimento. Resuspende en 6,5 mL de medio RPMI1640 sin suero atemperado a 37°C.
4. Homogeniza la suspensión mediante agitación suave (cerrar el tubo e invertir o pipetear arriba-abajo suavemente sin que se forme espuma).
5. Toma 20 ul de la suspensión y resévalos para realizar un contaje y saber la cantidad real de células que has puesto en cada pocillo (tendrás que hacer cálculos)
6. Siembra en cada pocillo 1 mL de la suspensión celular. En todos los pocillos ha de haber la misma cantidad de células. Asumiremos como cantidad inicial de células en cada pocillo la cantidad teórica sembrada.
7. Añade 1 mL de medio RPMI1640 1x P/S, 1x L-Gln con el doble de suero al que le corresponde al pocillo. Agita suavemente para uniformizar.
8. Observa la placa en el microscopio. Fíjate en el aspecto que tienen las células. Toma una imagen
9. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C) hasta el día siguiente
10. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

Días 2, 3, 4 y 5: Procedimiento de cuantificación del crecimiento

El objetivo final de este experimento es llegar a establecer una curva de crecimiento en las diferentes condiciones. Para ello necesitaremos tomar muestras diariamente, cuantificarlas y anotar y registrar cuidadosamente los datos. Los puntos indicados a continuación tienen que hacerse diariamente en algún momento de la sesión de prácticas:

1. Llevar con cuidado la placa de cultivo a la cabina de flujo.
2. Agitar con ayuda de una pipeta P1000 homogeneizando suavemente la suspensión celular.
3. Comprobar que las células están uniformemente resuspendidas. Tomar una fotografía si está libre el microscopio.
4. En la cabina, tomar una muestra representativa de 20 μ l de cada uno de los pocillos (en tubos eppendorf bien rotulados). Añadir 20 μ l de Azul Tripan.
5. Devolver la placa al incubador.
6. Contar. Cada pocillo será contado por cada alumno en al menos una cámara de Neubauer (4 superficies de 1 mm² cada día) Se anotarán los valores de cada área y la media por alumno.
7. El último día del experimento, una vez hayamos contado y fotografiado las células, ya podemos descartarlas y seguir el protocolo de desecho de residuos.

Observación: Sería interesante anotar el día y hora en el que se realiza el conteo para poder relacionar con mayor precisión el número de células en el cultivo y el número de horas que éste ha crecido... o, alternativamente, intentar hacer el conteo de las células aproximadamente a la misma hora cada día.

D.2 Curva de crecimiento en células adheridas: células HeLa

En este experimento queremos hacer un seguimiento del crecimiento de una población de células adheridas. Para ello descongelaremos células HeLa y las sembraremos en diferentes condiciones, en las que se mantendrá siempre el mismo medio de cultivo pero suplementado con diferentes concentraciones de FBS. El objetivo es poder observar si la concentración de suero afecta o no al crecimiento, en base a los conteos celulares que vayamos obteniendo. Sin embargo el conteo de las células de una población adherida tiene algunas dificultades extra por lo que realizaremos dos tipos de cuantificación:

- Cada día tomaremos 4 fotografías de un campo al azar con el mismo aumento (obj 20x) sobre las que determinaremos el número de células promedio por campo. El conteo puede hacerse manualmente o mediante análisis y cuantificación de imagen usando el software ImageJ (anexo 3).
- El último día (viernes) cuantificaremos la población celular mediante la técnica CVDE (Cristal Violet Dye Elution)

El experimento se realizará en una placa de 6 pocillos por grupo siguiendo el siguiente esquema:

| | | |
|-----------------|-----------------|----------------|
| DMEM | DMEM + 0.5% FBS | DMEM + 1 %FBS |
| DMEM + 2.5% FBS | DMEM + 5% FBS | DMEM + 10% FBS |

Nota: Al suministrarse las células congeladas es preciso que éstas se adhieran primero en un medio completo con un 10% FBS durante 24h. Sólo después de ese periodo de tiempo cambiaremos el medio de modo que cada pocillo tenga medio con un porcentaje de suero diferente.

Material necesario:

- 1 alícuota de células HeLa congeladas que proporcionará el profesor
- 1 placa de cultivo de 6 pocillos
- 15 ml Medio de cultivo celular atemperado a 37°C (DMEM completo 1g/L)
- 1 tubo estéril de 15 ml, viales eppendorfs estériles
- Puntas azules estériles para pipeta automática
- Pipetas automáticas
- Centrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Azul tripano
- Cámara de conteo celular
- Microscopio óptico, luz transmitida
- PBS (solución de fosfatos 100 mM tamponada (pH 7,4), isotónica)
- Metanol frío (-20°C)
- Solución de Cristal Violeta al 0,1% en agua destilada (filtrado).

- Lector de placas (espectrofotómetro)

Día 1 (lunes): siembra del cultivo de células HeLa

1. En este experimento utilizarás medio de cultivo DMEM 1g/l, 1x P/S, 1X L-Gln 10% FBS (medio DMEM 1 completo). Asegúrate que tienes suficiente preparado y atemperado antes de empezar, pasa 5,5 mL de medio DMEM 1 completo a un tubo de 15 mL usando una P1000.
2. El profesor te suministrará una o más alícuota de células HeLa congeladas. Descongélalas siguiendo el protocolo siguiente:
 1. Descongela la alícuota de células en un baño de agua a 37°C hasta que esté casi descongelado (ha de verse aún algo de hielo en la solución) (de 30 seg a 1 min). Inmediatamente seca el tubo y llévalo a la cabina de flujo laminar.
 2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.
 3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave (cerrar el tubo e invertir o pipetear arriba-abajo suavemente sin que se forme espuma).
 4. Se centrifuga durante 4 min a 1000 rpm (600 – 700 xg) (centrifuga para tubo eppendorf). Poner el tubo de forma que se pueda reconocer en que parte del fondo se formará el sedimento.
 5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación en el contenedor de líquidos. Si se extrae con la pipeta es importante que no se acerque en ningún momento a la zona de la base del tubo en la que se encuentra el sedimento.
 6. Se resuspende el sedimento celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
 7. Tomar 20 ul y ponerlos en un tubo eppendorf para proceder a contaje y determinación de viabilidad (anexo 1).
3. Se pasa todo el volumen de suspensión celular a un tubo de 15 mL en el que tendrás 5,5 mL de DMEM 1 P/S L-Gln 10% suero. Agitaremos suavemente con P1000 o mediante inversión. Es muy importante que la suspensión celular sea homogénea.
4. Coloca 1 mL de la suspensión celular en cada uno de los 6 pocillos de la placa.
5. Añade a cada pocillo 0,5 mL de medio DMEM 1g/l completo 10% FCS.
6. Agita suavemente para homogeneizar en forma de cruz . Observa el cultivo con el microscopio de contraste de fases. Lleva la placa al incubador.
7. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).
8. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

Día 2 (martes): sincronización del cultivo celular (cambio de medio sin suero)

1. Con una pipeta P1000 y con cuidado de no distorsionar el cultivo aspira y elimina el medio de los pocillos procurando hacerlo de prisa para que las células nunca queden 'en seco' (máximo tres pocillos a la vez)
2. Añade a cada pocillo 1 mL de PBS a 37°C
3. Aspirar PBS y añadir 1.5 ml/pocillo de medio DMEM 1g/l completo sin suero
4. Llevar a la incubadora de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C)

Día 3 (miércoles): cambio de medio (diferentes concentraciones de suero)

1. En este experimento utilizarás medio de cultivo DMEM 1g/l, 1X P/S, 1X L-Gln con diferentes concentraciones de suero. Asegúrate que tienes suficiente preparado y atemperado antes de empezar. Los medios que precisas son :
 - 6,5 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 0% suero
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 0% suero
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 1,0% FBS
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 2,0% FBS
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 5,0% FBS
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 10,0% FBS
 - 1,2 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 20,0% FBS
2. Nota: para preparar los medios que necesitas es recomendable preparar una solución de DMEM 1g/L con antibióticos y L-Gln pero sin suero. Sobre esta solución puedes ir añadiendo la cantidad de suero necesaria. Puedes hacer las soluciones en tubo eppendorf.

3. Con una pipeta P1000 y con cuidado de no distorsionar el cultivo aspira y elimina el medio de todos los pocillos procurando hacerlo deprisa para que las células nunca queden 'en seco'
4. Añade a cada pocillo 1 mL de DMEM 1g/l P/S L-Gln 0% FBS.
5. Añade a los pocillos 1ml de los siguientes medios preparados anteriormente :
 - 1 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 0% FBS
 - 2 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 1,0% FBS
 - 3 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 2,0% FBS
 - 4 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 5,0% FBS
 - 5 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 10,0% FBS
 - 6 – 1 mL de DMEM 1g/L, 1x Glu, 1x P/S, 20,0% FBS
6. Agita suavemente para homogeneizar y comprueba con el microscopio el estado de las células. Toma fotografías (al menos 4 por pocillo de campos elegidos al azar).
7. Mantener en la incubadora de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).
8. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

Días 4, 5: Procedimiento de cuantificación del crecimiento: toma de imágenes

El objetivo final de este experimento es llegar a establecer una curva de crecimiento en las diferentes condiciones. Para ello necesitaremos tomar muestras diariamente, cuantificarlas y anotar y registrar cuidadosamente los datos:

1. Tomar un mínimo de 4 fotografías de cada uno de los pocillos, **cada día**.
2. Mantén la placa el menor tiempo posible fuera de la incubadora.

Día 5: Procedimiento de cuantificación del crecimiento: toma de imágenes + CVDE ('Cristal Violet Dye Elution')

1. El último día de prácticas, después de haber tomado las fotografías correspondientes, se teñirán las células con una solución de Cristal Violeta al 0.1 %. El procedimiento es el siguiente:
2. Aspirar el medio de cultivo de todos los pocillos de la placa y añadir 1 ml de PBS enfriado a 4°C (mantener en hielo).
3. Aspirar y volver a añadir 1 ml/pocillo de PBS a 4°C. Esperar entre 30 y 60 segundos.
4. Aspirar el PBS y añadir 1 ml de Metanol a -20°C (importante mantener el metanol lo más frío posible, por lo que la placa se mantendrá en hielo)
5. Incubar en metanol -20°C de 3 a 5 minutos (mantener en hielo) y aspirar.
6. Añadir 1 ml de Cristal Violeta al 0,1 % a cada pocillo e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Aspirar la Solución de Cristal Violeta y lavar varias veces con agua destilada, mejor por inmersión.
8. Dejar secar en la estufa de 37°C (no incubadora). (A partir de este paso puede dejarse el tiempo que sea necesario)
9. Tomar fotografías de las células teñidas en el fondo de la placa.
10. Añadir 0,5 ml de 10% metanol-5% Ácido acético glacial. Esperar a que se disuelva el colorante (aprox 2 minutos) e ir agitando circularmente la placa.
11. Poner en una placa de 96 pocillos 3x100 ul por pocillo de la placa de 6 (leer la solución por triplicado).
12. Leer la DO a 595 nm usando el espectrofotómetro de placa (programa CVDE).
13. Guardar los resultados.

E. Experimento 3: Proliferación de células adherentes NRK: cicatrización de herida (*wound healing*)

El objetivo de esta práctica es observar el fenómeno de proliferación y de migración de células adheridas en placa. Para ello se hará una herida ('scratch test') en una placa de células a máxima confluencia y se observará la recuperación de la misma en presencia de dos concentraciones de suero.

Material necesario (por grupo):

- 1 viales de células NRK (10⁶ células/vial)
- 2 placas de petri de 35 mm
- Medio de cultivo celular (día 2 : DMEM 4,5 g/L P/S L-Gln 10% FBS; día 3 : DMEM 4,5 g/L P/S L-Gln al 0,5% y al 10%) atemperado a 37°C
- Azul tripan
- Cámara de contaje celular

- Microscopio óptico, luz transmitida

Día 1 (lunes): siembra de la placa para herida

Procedimiento del ensayo de cicatrización *in vitro* (scratch test)

1. El profesor explicará al inicio de la práctica los conceptos generales y la finalidad del experimento. Estate atento a las explicaciones y ten en cuenta que como primer paso realizaremos unas marcas en los bordes inferiores de la placa, como si quisiésemos trazar una línea "ecuador". Alternativamente se pueden trazar dos líneas paralelas discontinuas en la base de la placa.
2. Sigue las indicaciones de descongelación y siembra de células NRKs indicadas en el apartado C1 (páginas 14 y 15). El volumen final de medio por placa es de 1,5 mL.
3. La única diferencia respecto a las indicaciones anteriores es que en este caso utilizarás alícuotas de células a mayor densidad y que sembrarás dos placas. El medio en el que has de sembrar las células es DMEM 4,5g/L P/S L-Gln 10%FBS.
4. Una vez has seguido todo el proceso observa la placa en el microscopio. Fíjate en el aspecto que tienen las células.
5. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).
6. A las 2h comprobar el estado de adhesión de las células. En cultivos NRK se observa 'spreading' a partir de los 30 min de la siembra. Fíjate en el aspecto que tienen las células.
7. Guarda la placa en la incubadora de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C) hasta el día siguiente.
8. Asegúrate de dejar la cabina de flujo laminar en condiciones de uso adecuadas, con el material correctamente recogido y limpia (tal como te gustaría encontrarla). Todo el material contaminado ha de ser descontaminado o retirado de la cabina antes de pararla.

Día 2 (martes): observación y fotografía.

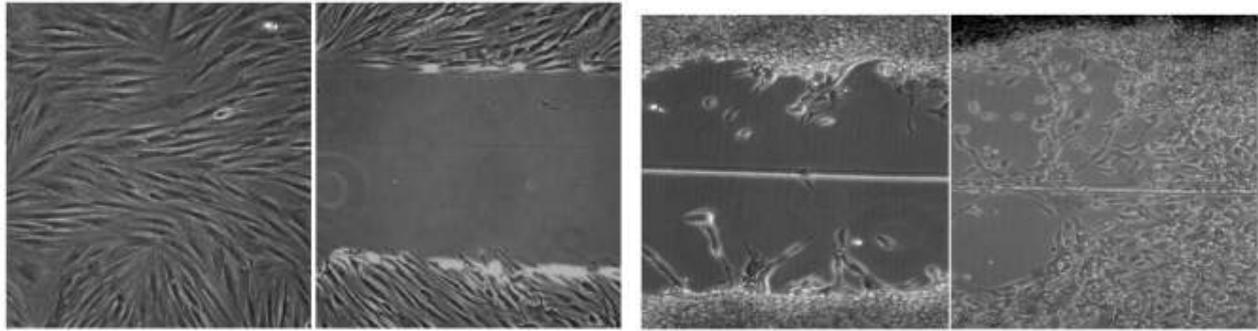
Día 3 (miércoles): herida

1. Después de 48 horas (día 3) esperamos que el cultivo haya llegado a la confluencia. Comprobarlo con el microscopio de contraste de fases. Marcar las placas con el número de grupo + 0% y 10%.
2. Captaremos de 2 a 4 imágenes de la zona imaginaria como "línea ecuador".
3. En la cabina de flujo laminar, y en condiciones de esterilidad, se practica una "herida" siguiendo la "línea ecuador" imaginaria, con la ayuda de una punta amarilla/azul estéril. La "herida tiene que ser lo más recta y regular posible. Para hacerla se mantiene la punta firmemente apoyada en la placa y se mueve la placa.
4. Lavar la placa 2 veces con PBS 100 mM estéril (atemperado a 37 °C) con el fin de eliminar las células arrastradas.
5. En la placa 0% pondremos 1,5 mL de medio DMEM 4,5 P/S L-Gln 0% FCS, y en la placa 10% el mismo volumen (1,5 mL) de medio DMEM 4,5 P/S L-Gln 10% FCS.
6. Captar de 2 a 4 imágenes de la zona de la herida. Estas imágenes son las que utilizaremos para cuantificar el cierre de la "herida" o el efecto "cicatrizante", por lo que cuantas más imágenes podamos tomar, y más representativas sean, mejor.
7. Guarda la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C) hasta el día siguiente.

Días 4 y 5 (jueves y viernes): recuperación de la herida

Realizar las captaciones de imágenes por microscopía de contraste de fases y las medidas de área cada 24 h, hasta que la herida esté completamente cerrada.

Mantener la placa en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C).



Ejemplo de cicatrización de herida en fibroblastos dérmicos humanos: monocapa en confluencia, en el momento de practicar la herida y en las imágenes inferiores después de 6 y 48 h de recuperación.

F. Experimento 4. Eficiencia de transfección.

El objetivo de este experimento es determinar el efecto de la confluencia celular en la eficiencia de transfección. Para ello se empleará la línea celular HeLa, la cual transfectaremos con un plásmido vacío o control y un plásmido que codifica para una proteína fluorescente y específica de un compartimento celular. Concretamente se emplearán

1. Un plásmido vacío (control negativo) (pCDNA6.2/V5-Hygro-DEST)
2. Un plásmido que codifica para una proteína RFP

Puedes encontrar más información de los plásmidos utilizados en el anexo 2

Día 1 (lunes): siembra de la población celular sobre cubreobjetos de vidrio

1. Asegúrate de disponer de los volúmenes de medio a temperatura necesarios: DMEM 1g/L P/S L-Gln 10% FBS.
2. En condiciones de esterilidad, abre la placa de 24 pocillos, deposita la tapa cuidadosamente en la superficie de trabajo de la cabina con la parte interior mirando hacia arriba (sin tocar la superficie).
3. Deposita 1 cubre-objetos estériles en 6 pocillos siguiendo las instrucciones del profesor. Para ello utilizarás unas pinzas de punta fina estériles, por lo que la parte útil (punta) no tiene que tocar en ningún momento ninguna superficie susceptible de contaminación (ropa, borde exterior de la placa, etc) Si así fuese, sumerge la punta en alcohol de 70% y deja que se seque al aire dentro de la cabina de flujo.
4. Añadir 0.5 ml de medio DMEM 1g/L P/S L-Gln 10% FBS
5. Tapa la placa en espera de tener la suspensión celular lista para la siembra.
6. Pide al profesor la suspensión celular de las células que has de sembrar.
7. Prepara en un eppendorf 1.5 ml de una suspensión celular a 1×10^6 cel/ml, rotúlalo como **S1**.
8. Has de preparar una batería de diluciones 1:2 (v/v) en DMEM 1g/L P/S L-Gln 10% FBS de cuatro suspensiones celulares. Te proponemos que prepares 3 tubos (**S2**, **S3** y **S4**) con 0,7ml de DMEM 1g/L P/S L-Gln 10% FBS y pases 0,7 ml de **S1** a **S2** y 0,7 ml de **S2** a **S3** y así sucesivamente.
9. Siembra en cada uno de los pocillos 0.2ml de la suspensión celular correspondiente

| | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|--|--|
| S1 ● | S2 ● | S3 ● | S4 ● | | |
| S2 ● | S2 ● | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

10. Llevar a la incubadora (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C) hasta el día siguiente.

Día 2 (martes): transfección

Esquema de transfección

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| A1  RFP | A2  RFP | A3  RFP | A4  RFP | | |
| B1  Control |  | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Plásmidos empleados:

- Control
- p-RFP

Soluciones a preparar por el alumno (al momento):

Reactivos necesarios (por pocillo):

- 1,5 ul de FuGene® 6 (Roche, lo entrega el profesor)
- 0,5 ml de Opti-MEM (lo entrega el profesor)
- 1 ug de plásmido control
- 4 ug de plásmido RFP
- PBS 100 mM
- Medio de cultivo completo (con 10% FBS)

Solución de DNA: (a preparar antes de empezar el experimento y por pocillo).

- El profesor entregará la mezcla de FuGene y Opti-MEM lista y agitada. Un volumen de 275 ul por grupo. Se ha preparado mezclando por pocillo 1,5 ul de FuGene en 50 ul de Opti-MEM y agitando vigorosamente en el vórtex (por pocillo).
- La mezcla de la solución de OptiMEM+FuGene con el DNA se ha de preparar por grupo en la cabina de flujo (ver procedimiento). El profesor entregará también dos tubos eppendorfs

Procedimiento:

1. Comprueba y lleva contigo todos los reactivos necesarios para la transfección incluidos los plásmidos.
2. Compruebe el estado de confluencia de los diferentes pocillos. Toma cuatro imágenes al azar de cada pocillo
3. En la cabina de flujo laminar añade 50 ul de la mezcla de FuGene+Opti-MEM (entregado por el profesor) al tubo que contiene 1 ug del plásmido control correspondiente (Control) y 220ul de la mezcla de FuGene+Opti-MEM al tubo que contiene 4 ug del plásmido correspondiente a RFP (RFP).
4. Agita vigorosamente (vórtex) e incuba 30 minutos a temperatura ambiente en la propia cabina de flujo.
5. Aspira el medio de cultivo con cuidado de los pocillos.
6. Lava las células con 1 ml de PBS 100 mM (puede que esté etiquetado como 1X) estéril atemperado a 37°C
7. Añade a cada pocillo 0,5 ml de Opti-MEM
8. Añade 50 ul de la mezcla que contiene el plásmido RFP a los cuatro primeros pocillos (A1-A4) y 50ul de la mezcla que contiene el plasmido al pocillo B2 (siga el guión
9. Incuba a 37°C en la incubadora (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C durante un mínimo de 24 h)

Día 3 (miércoles): cambio de medio y primera observación de la transfección

1. Observa las células al microscopio de contraste de fases para comprobar su estado.
2. Aspira con cuidado el medio utilizado en la transfección usando P1000 y sin hacer ningún lavado, añadir 0,7 ml de medio completo (DMEM 1 g/L P/S L-Gln 10% FBS)
3. Incuba durante 24 horas en el incubador de cultivos celulares (5% CO₂, 95% aire, 90% humedad, 37°C)

Día 4 (jueves): fijación del cultivo

4. A partir de aquí, el proceso puede realizarse fuera de la cabina ya que no es necesario que las células sigan estériles (puedes utilizar material no estéril).
5. Aspira el medio de cultivo y lava las células con 1 ml de PBS 100 mM.
6. Fija las células a temperatura ambiente durante 10 minutos con la solución de fijación que tendrás que preparar el mismo día en campana de extracción.

Solución de fijación:

| | |
|-------------------------|--------|
| - PB 0.2 M | 2 ml |
| - Sacarosa 1 M | 240 ul |
| - *Paraformaldehído 16% | 760 ul |
| - Agua MQ | 1 ml |

* El Paraformaldehído es tóxico y desprende vapores. Toma precauciones tanto personales como en la utilización de materiales: tanto el proceso de fijación como sus lavados se realizarán en la cabina de extracción y se utilizará material específico (por ejemplo pipetas, NUNCA utilizar las pipetas de cultivos). Te daremos un tubo con 760 ul de paraformaldehído 16% en el que irás añadiendo el resto de las soluciones arriba indicadas (también ya preparadas)

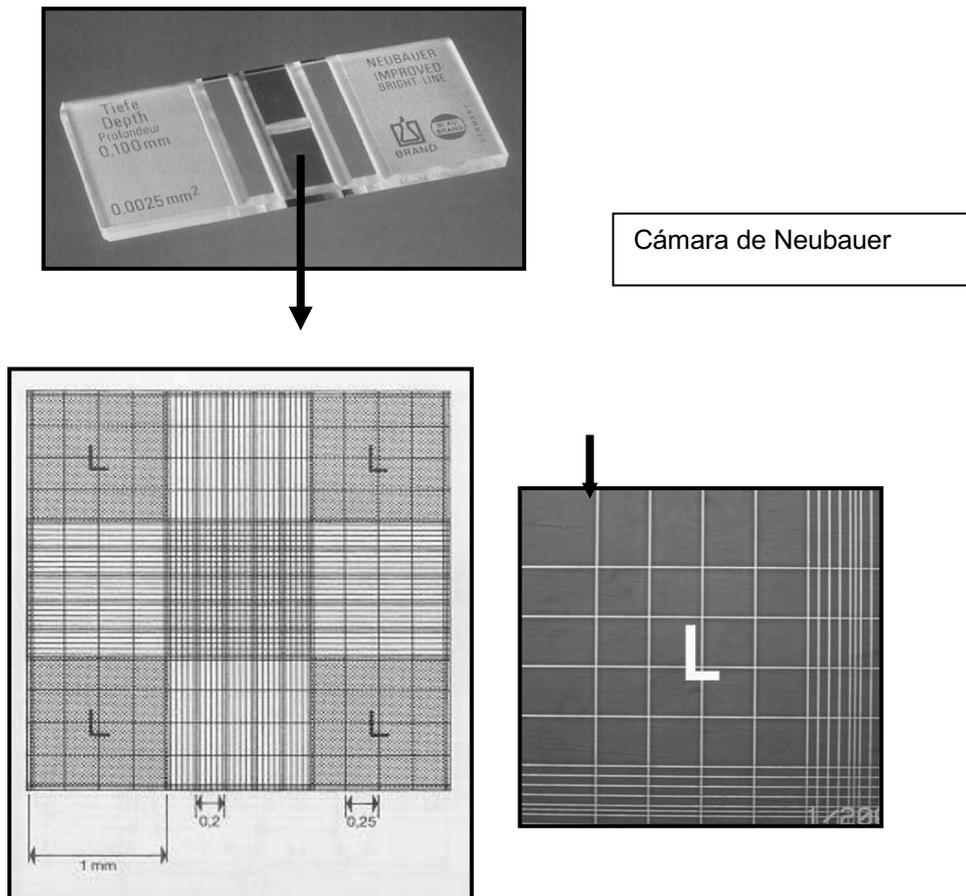
7. Lava con PBS 100 mM
8. El profesor distribuirá una alícuota de Hoescht por grupo (protégela de la luz con papel de aluminio; AVISO: recuerda que es un agente intercalante en el DNA y con conocido efecto cancerígeno).
9. Añade 20 ul de PBS a la alícuota de solución stock de Hoescht que te han dado.
10. Añade 1 ml de PBS por pocillo y 4 ul de la solución stock de Hoescht para marcar los núcleos (la distribuye el profesor, Incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos protegiendo de la luz con papel de aluminio. A partir de este momento siempre ha de estar protegida de la luz.
11. Lava dos veces con PBS 100 mM.
12. Procede al montaje de los cubreobjetos con medio de montaje específico sobre portaobjetos, que previamente habrás marcado/identificado. PARA ESTE PUNTO SE DARAN INSTRUCCIONES DE MANIPULACIÓN IN SITU POR EL PROFESOR.
13. Deja secar/polimerizar el medio de montaje, dejando los portaobjetos dispuestos horizontalmente el mayor tiempo posible antes de la observación.
14. Las preparaciones se conservan en bandejas de portaobjetos a 4°C. Muy importante que se monte una serie completa (cubreobjetos 1 a 8) en un portaobjetos.

G. ANEXOS

D.1 ANEXO 1: PROCEDIMIENTOS DE CONTAJE

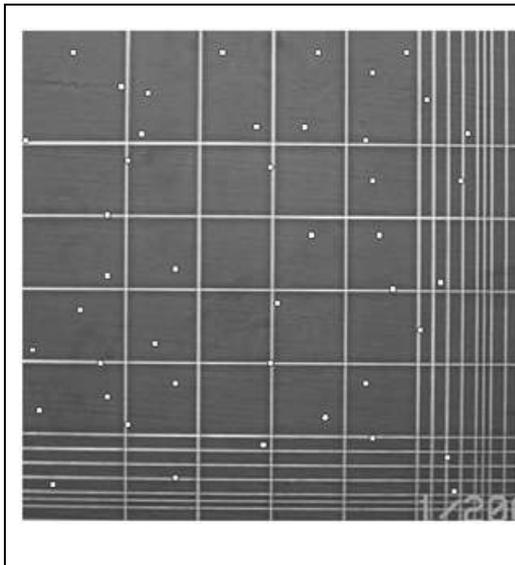
La determinación del número de células en una suspensión celular se puede realizar empleando contadores celulares automáticos (por ej. Coulter) o cámaras de conteo celular de las que hay muchas. La que describimos a continuación es la denominada cámara de Neubauer, y se caracteriza por disponer, en un portaobjetos de cristal, de dos áreas de conteo independientes que delimitan un volumen de 0,1 ul. Éste volumen es el comprendido entre la rejilla grabada en el portaobjetos y el cubreobjetos de cristal.

En la imagen siguiente se aprecia respectivamente la cámara de Neubauer, el detalle de una de las áreas de conteo, formada por un total de 9 cuadrados de 1 x 1 mm de lado (área L, divididos a su vez en 16 cuadrados menores de 0,25 x 0,25 mm de lado).



Para contar usando la cámara de Neubauer:

- se coloca el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer (portaobjetos)
- se introduce una gota con la suspensión celular depositando una gota 'al lado' del cubreobjetos de modo que penetre por capilaridad (nota: ¡¡cuidado con el mantenimiento de la esterilidad del cultivo!!)
- se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y se enfoca empleando sucesivamente los objetivos de 4x y 10x. Es importante que se gradúe correctamente el diafragma y la posición del condensador para obtener una iluminación adecuada.
- se cuentan las células comprendidas en el interior del área de 1 x 1 mm de lado adoptando un criterio de inclusión / exclusión como por ejemplo el siguiente : 'se cuentan como 'dentro' aquellas células que estén comprendidas en el área de conteo sin tocar ningún lado además de aquellas que toquen el lado superior y el izquierdo pero no se consideran dentro las que toquen el lado inferior o el derecho'
- se repite el proceso para las otras tres áreas L que hay en cada área de conteo de la cámara de Neubauer, obteniéndose los valores de conteo : N_1 , N_2 , N_3 y N_4 .
- se determina el número de células por mL aplicando la expresión:
Número de células / mL = media (N_1 a N_4) * 10.000
Que se deduce del hecho de que el volumen contado es 0,1 ul ($0,1 \text{ mm}^3$)



Por ejemplo en la imagen se pueden contar un total de 15 'células', de las cuales según el criterio antes mencionado consideraríamos dentro un total de 13, excluyendo aquellas que tocan el lado derecho y abajo.

La concentración 'celular' de la suspensión contada sería de 130000 cel/mL.

Determinación de la viabilidad de una suspensión celular

Una célula se considera viable cuando es capaz de crecer, mantener su actividad metabólica, etc.. en el cultivo. Existen diferentes estrategias experimentales que permiten determinar la viabilidad de un cultivo celular, entre ellas la medida de parámetros funcionales como la actividad deshidrogenasa mitocondrial, la liberación de lactato deshidrogenasa, etc... Uno de los métodos más empleados sin embargo se basa en el uso de un colorante coloidal, el Azul Tripán (Trypan Blue). Este colorante tiñe el interior celular de un color azul, pero al ser coloidal sólo puede acceder al interior de aquellas células que tienen perforada la membrana, es decir de aquellas que son no viables.

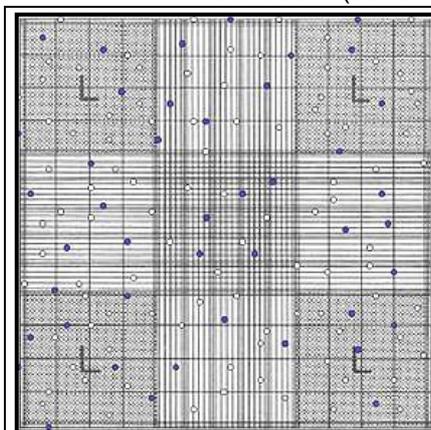
Así pues el procedimiento de determinación de viabilidad mediante la coloración con Azul Tripán supone los pasos siguientes:

- poner en un tubo eppendorf 20 ul de una suspensión celular (nota : ¡¡cuidado con el mantenimiento de la esterilidad del cultivo!!)
- añadir 20 ul de una solución de Azul Tripán 0,25%
- mezclar bien la suspensión con el colorante pipeteando arriba y abajo.
- colocar en la cámara de Neubauer 10 ul de la mezcla.
- poner la cámara en el microscopio y contar, distinguiendo las células viables (refringentes o 'blancas') de las células no viables (usualmente mayores, azules).
- se determinan los parámetros :
- concentración de células totales (número de células totales / mL)

$$\text{Conc totales (cel/mL)} = \text{media de células (totales)} * 10000 * 2$$
- concentración de células viables (número de células viables / mL)

$$\text{Conc viables (cel viables / mL)} = \text{media de células viables} * 10^4 * 2$$
- viabilidad (%)

$$\text{Viabilidad} = (\text{conc viables} / \text{conc totales}) * 100$$



En el ejemplo, los valores son :
 blancas / azules : 12/2; 12/3; 10/6; 11/4;

Conc totales : 300000 cel/mL

Con viables : 240000 cel/mL

Viabilidad : 80%

D.1 ANEXO 2: SISTEMAS DE ANALISIS DE IMAGEN

Aunque existen muchos programas de análisis de imagen que podríamos utilizar proponemos que uséis ImageJ. Es un software gratuito, fácil de usar y fiable. El link para descargarlo es: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. Asegúrate de que descargas la versión adecuada para el sistema operativo que uses (Linux, Windows XP, Vista, 7) y ten presente que especialmente en Windows 7 distingue entre el sistema de 32 y de 64 bits. Además has de tener presente si dispones ya de Java instalado en tu ordenador.

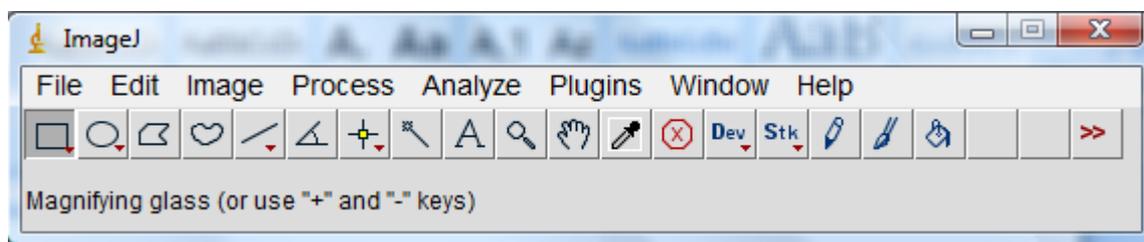
En la misma dirección podéis encontrar también plugins, manuales, etc. Para estas prácticas solo es necesario el módulo básico. Las instrucciones para utilizarlo se darán "in situ" por el profesor y básicamente se referirán:

- Abrir/importar imágenes (File>open)
- Separación de canales (Image>color>Split/merge channels)
- Medidas (analyze, measurements)
- Contaje de células (plugins>analyze>cell counter)

De los manuales disponibles (desde simples a muy complejos) recomendamos los siguientes :

- http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:beginner_help:imagej_beginner_s_tutorial (video tutorial, incluye las instrucciones para la instalación)
- http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:particle_counting_-_automated_and_manual (contaje automático y manual; mejor utilizar el manual)
- http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:utilities:creating_montages_with_magic_montage (herramienta útil para hacer montajes fotográficos)

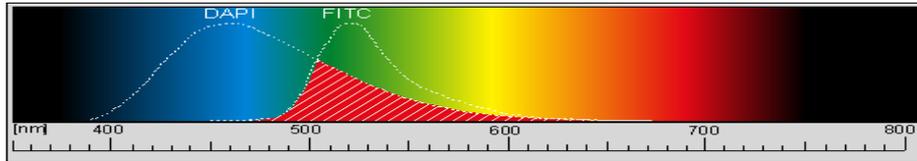
Una vez instalado el software un icono (imagen) nos permite abrir el programa que presenta una única ventana, su menú de control :



Observación: puedes usar para la gestión de imágenes otros programas de los que utilices habitualmente (por ej Picassa) aunque éste no es recomendable para la edición de las fotos pues no puedes controlar los parámetros del mismo. Un programa muy completo para la edición de fotografías (comercial) es Photoshop.

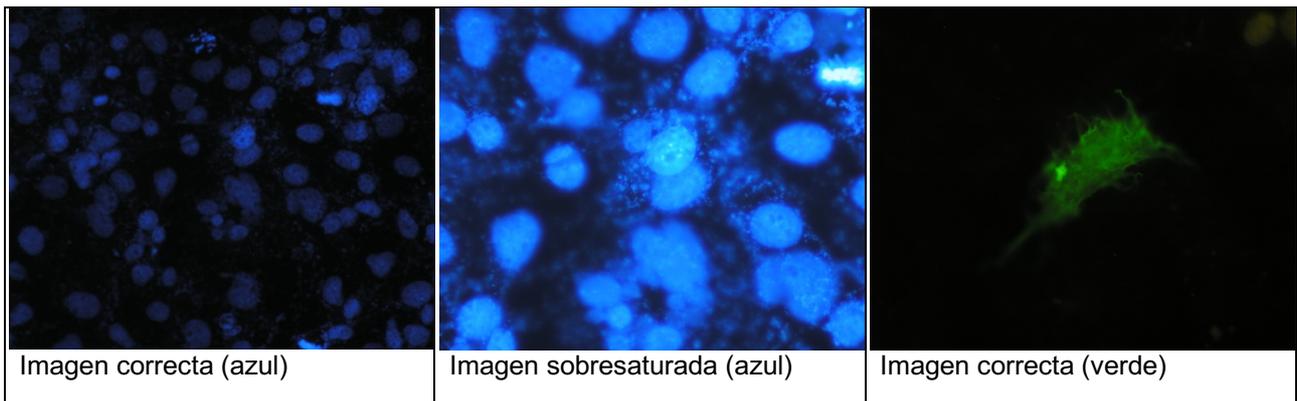
Algunas consideraciones:

- Para llegar a un mismo resultado final a veces se pueden utilizar diferentes caminos, procesos y/o aplicaciones. Recordad que es un sistema Open-source y que ha participado mucha gente desarrollando diferentes herramientas, por lo que sirve para muchas aplicaciones. Utilizad, preferentemente, las que os indicamos. Obviad sobre todo las aplicaciones referentes a macros, stacks, 3D, etc.
- El botón HELP no es útil. Si necesitáis ayuda u os atascáis en algún proceso, buscad directamente sólo la información que necesitáis en este anexo o en los tutoriales que os indicamos. En cualquier caso, siempre podéis consultar con el profesor.
- Uno de los problemas que os podéis encontrar en el momento de realizar montajes con las fotografías de fluorescencia o combinaciones de canales (*merge channels*). El marcaje utilizado para núcleos (Hoesch o Bis-benzimida), aunque lo veáis azul o lo queramos interpretar como azul, es en realidad cian, o es decir, emite en azul y verde. Si no se dispone de filtros de suficiente banda estrecha (como es el caso) podemos tener señal también en el canal verde (mirar espectro) dificultando la combinación de imágenes cuando tenemos dos canales.



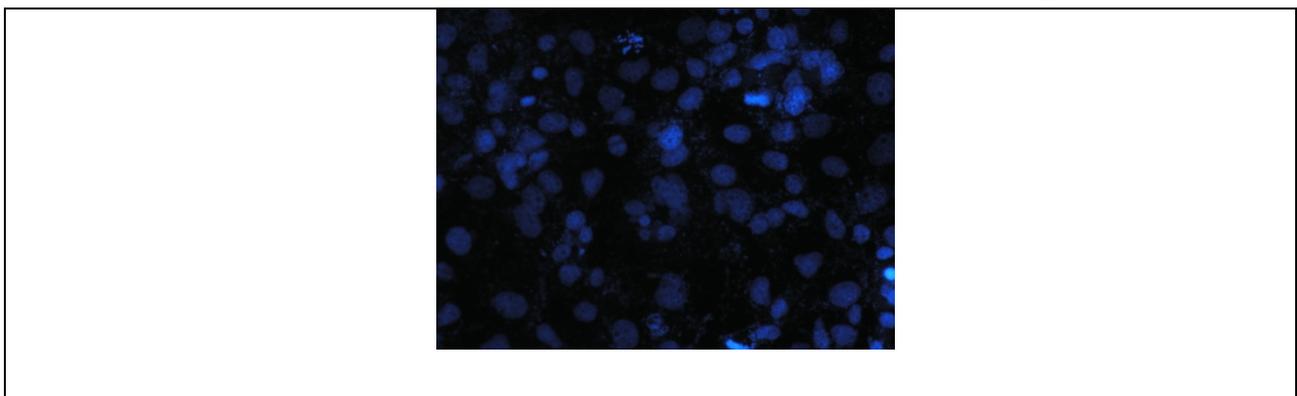
- A este hecho tenemos que añadir que en algunos casos, si no captamos las imágenes en condiciones óptimas podemos tener saturación en alguno de los canales. Para corregirlo, necesitaremos corregir y eliminar tanto el fondo (*background*) como el cruzamiento de los dos canales.
- Estos puntos se explicarán por el profesor directamente en clase pero, en resumen, los pasos a seguir para combinar imágenes son (la información ampliada está en los tutoriales y en el manual):
 1. Abrir las dos imágenes a combinar (File>open)
 2. Separar los canales (Image>color>Split channels)
 3. Escoger las imágenes en el canal que tenemos la señal
 4. En los casos problemáticos (ver ejemplos más adelante) ajustar los niveles y el brillo y el contraste.
 5. Una vez están correctas y vemos la señal y la intensidad que queremos ver, mezclar los canales con el color deseado (Image>color>Merge channels)
 6. Guardar las imágenes!!!

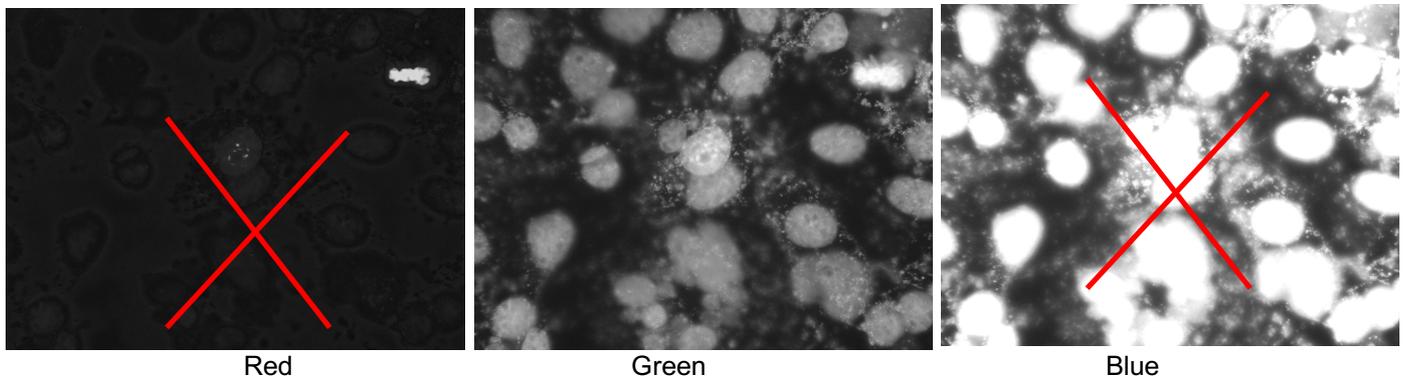
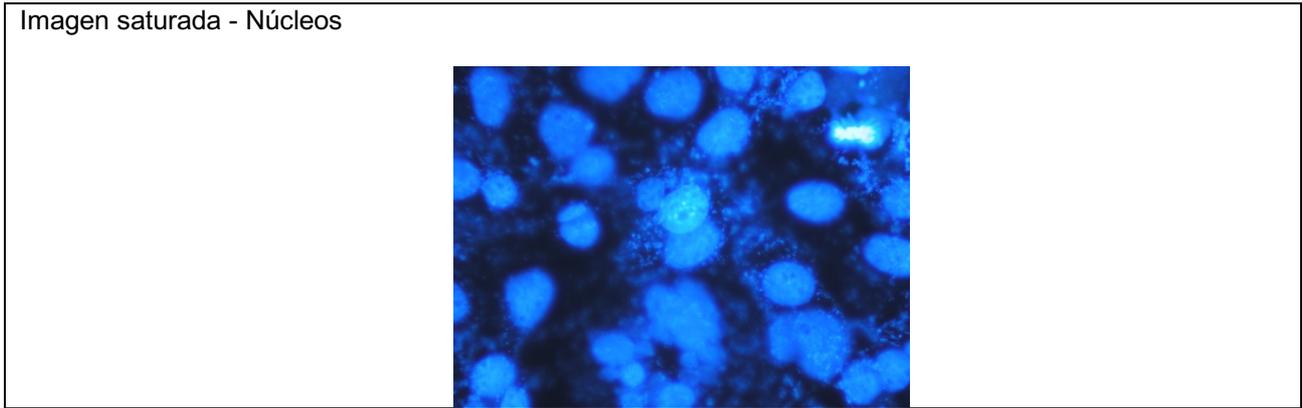
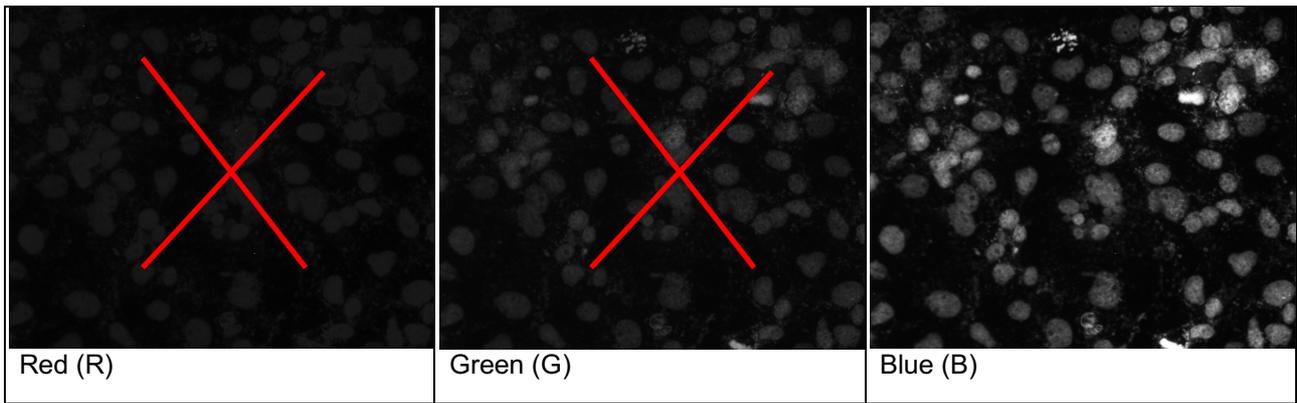
Ejemplos:



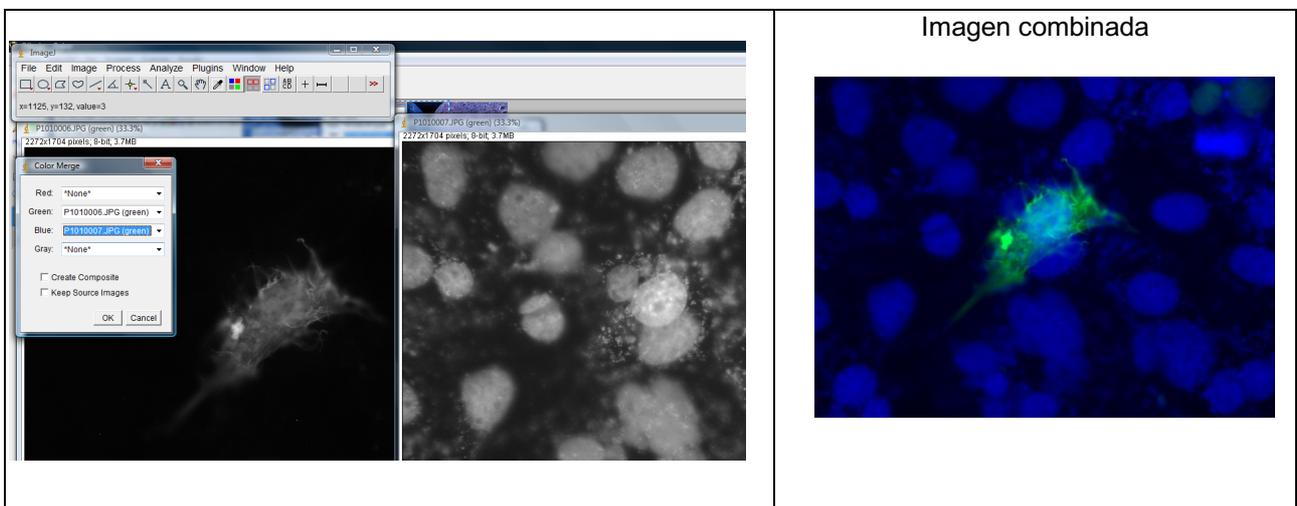
Para combinar los canales de imágenes captadas correctamente es suficiente con seguir las indicaciones. En el caso de trabajar con imágenes sobresaturadas serán necesarios pasos intermedios:

1. Separar los canales (Image>color>Split channels)
2. Es posible que en el canal azul tengamos la imagen “sobresaturada”; lo reconoceremos por un exceso de señal en el canal azul y una “correcta” señal en el verde.
3. En este caso, descartaremos la imagen de la señal azul y utilizaremos el canal verde de la imagen de Hoescht para introducirla en el canal azul de la imagen combinada (merge channels)





El proceso siguiente sería combinar los canales:



D.1 ANEXO 3: LIBRETA DE LABORATORIO

La libreta de laboratorio es individual, **obligatoria** y servirá al alumno para organizar el trabajo realizado en los experimentos e ir anotando resultados, dudas, incidencias, etc. A continuación se indican una serie de requisitos que deberían cumplir:

1. Idealmente, la libreta tendría que ser tipo “libro” es decir que no se pudiesen arrancar páginas. Alternativamente podéis usar libretas de espiral, páginas grapadas, etc pero siempre con las páginas numeradas.
2. No se permite arrancar ninguna página de la libreta: si hay algún tipo de equivocación se tacha con una cruz (no utilizar correctores blancos ni tachaduras ilegibles). No utilizar lápiz.
3. En la primera página indicar claro el nombre del alumno, nombre de la asignatura y grupo de prácticas. Es aconsejable indicar también una dirección de e-mail y/o de teléfono para localizaros en caso de pérdida.
4. Ir rellenando la libreta en orden cronológico y no dejar páginas en blanco (evitar las tentaciones de “ya lo rellenaré mañana”)
5. Al realizar diferentes experimentos cada día, identificar claramente en la libreta el número y tipo de experimento.
6. “Todos” los cálculos que hagáis (volumen de medios, contajes celulares, etc) también tienen que estar reflejados en la libreta.
7. Podéis anotar también explicaciones, comentarios, esquemas que os permitan entender el experimento, etc si así lo deseáis pero no es necesario repetir el guión de prácticas.

Las libretas serán observadas y evaluadas “in situ” por los profesores. Una buena libreta de laboratorio os facilitará la redacción del informe final de las prácticas.

D.2 ANEXO 4: INFORME DE PRÁCTICAS

El informe de prácticas ha de tener como máximo 20 páginas (numeradas). Contendrá la siguiente información:

1. Portada con los nombres de los integrantes del grupo, grupo, subgrupo y fecha.
2. Índice
3. Cada experimento debe tener la siguiente estructura: introducción, objetivos, resultados y discusión, conclusiones y, si se ha hecho servir, bibliografía.

3.1 La introducción ha de ser breve.

3.2 Los objetivos han de estar enumerados

3.3 En la sección de resultados y discusión. A medida que se describen los resultados obtenidos se discuten brevemente. La discusión se basa en vuestros resultados y como estos encajan con el conocimiento actual

3.4 Los resultados numéricos se han de presentar en forma de gráficos con sus barras de error. Si se desea incluir tablas estas han de ir en forma de anexo al final del trabajo.

3.4 La imágenes han de ser representativas y no repetitivas. Estas han incluir una barra de escala o indicar en el pie de figura qué objetivo se ha utilizado.

3.5 Todas las figuras (gráficas o imágenes) han de llevar un pie de figura en la que se incluye toda la información necesaria para que el lector pueda entender la figura sin la necesidad de leer el texto principal.

3.6 Las conclusiones han de ser breves y estar enumeradas.

3.7 Si se incluye la sección de bibliografía, las referencias han de seguir un mismo formato

**RÚBRICA DE EVALUACIÓN DE 'PRÁCTICAS DE CULTIVOS
CELULARES ANIMALES'**

NOTA: GUARDAR EL ARCHIVO COMO VALORACION_"NOMBRE GRUPO PRACTICAS".xls

| | |
|--------------------|------------------------|
| GRUPO DE PRÁCTICAS | Ejemplo: BT L01/L02 |
| Profesores | Profesor 1/ profesor 2 |
| Fecha | INDICAR SEMANA |

Escala de valoración del 1 al 10

Valoración máxima= 10

Valoración *in situ* durante las prácticas (individual)

| | | GRUPO 1 | | | | |
|---------------|--|---------|-------|-------|-------|-------|
| % ponderación | | Nom 1 | Nom 2 | Nom 3 | Nom 4 | Nom 5 |
| 5 | Asistencia y puntualidad (entrada y salida) | | | | | |
| 10 | Lectura previa del guión de prácticas | | | | | |
| 10 | Comprende el marco teórico básico para el desempeño de la práctica, incluidos los cálculos | | | | | |
| 10 | Libreta de laboratorio | | | | | |
| 15 | atención a explicaciones e instrucciones, muestra interés y pregunta al profesor | | | | | |
| 15 | Trabajo en grupo: organización, discusión, dinámica, etc | | | | | |
| 10 | Reposición del material de laboratorio, orden y limpieza | | | | | |
| 10 | Condiciones de esterilidad, trabajo en cabina | | | | | |
| 15 | Se esfuerza por alcanzar los objetivos de las prácticas; mejora durante la semana. Aprovechamiento | | | | | |
| 100 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

| | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| Nota final prácticas Media de valoración <i>in situ</i> y de la nota del informe | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|

Calificación informe (por grupo)

| ponderación | | 0-5 | 5-7 | 7-9 | 9-10 | NOTA | COMENTARIOS | NOTA | COMENTARIOS |
|-------------|--|--|--|---|---|------|-------------|------|-------------|
| 15 | Corrección formal | Texto con errores ortográficos o gramaticales. Lenguaje poco apropiado. Aspectos formales poco trabajados: portada, índice, páginas, estructura | Texto sin errores ortográficos o gramaticales. Lenguaje y aspectos formales correctos. | Texto bien redactado y sin errores ortográficos o gramaticales. Aspectos formales bien trabajados: portada, índice, estructura e integración de los capítulos | Texto muy bien redactado y sin errores. Aspectos formales excelentes: portada, índice, estructura de capítulos, integración adecuada de las imágenes | | | | |
| 20 | Presentación de datos (figuras, tablas) | Figuras y tablas poco cuidadas. No se indican datos estadísticos, incluyendo desviaciones. No se indican barras de escala en las imágenes | Figuras y tablas correctas. Algunos gráficos no indican desviaciones estadísticas o algunas imágenes no incluyen barra de escala | Figuras y tablas bien trabajadas e integradas en el texto. Los gráficos indican desviaciones estadísticas y las imágenes incluyen barra de escala | Figuras y tablas bien trabajadas e integradas adecuadamente en el texto. Los gráficos indican desviaciones estadísticas y las imágenes incluyen barra de escala | | | | |
| 20 | Contenido | Contenido mal estructurado, difícil de entender. No incluyen apartados mínimos de objetivos, metodología, resultados, discusión. La metodología se limita a la repetición del guión. | Estructura del contenido correcta | Contenido bien trabajado y estructurado. | Contenido muy bien trabajado y estructurado. Integración de los diferentes apartados de cada uno de los experimentos. | | | | |
| 20 | Discusión | El trabajo no está o no está suficientemente discutido en base a los resultados obtenidos | La discusión de los resultados es correcta y relaciona los resultados obtenidos | La discusión de los resultados está bien trabajada y relaciona los resultados obtenidos | La discusión de los resultados está muy bien trabajada y relaciona todos los resultados obtenidos | | | | |
| 10 | Conclusiones | El trabajo no incluye conclusiones o son incorrectas | El trabajo incluye conclusiones correctas solo en alguno de los experimentos | Las conclusiones se ajustan a todo el trabajo realizado | Las conclusiones se ajustan perfectamente a todo el trabajo realizado y están bien argumentadas | | | | |
| 15 | Percepción/opinión personal del professor | Puntuación que refleje la percepción personal del profesor respecto al trabajo y a la integración del equipo en él. Puede incluir aspectos no mencionados anteriormente. | | | | | | | |

100

| | |
|---------------------|----------|
| Nota informe | 0 |
|---------------------|----------|

| |
|----------|
| 0 |
|----------|

| | |
|---------------------|----------|
| Nota informe | 0 |
|---------------------|----------|