

6 grupos de
estudiantes



BIOLOGIA Y CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

1. OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS

El objetivo de estas prácticas es familiarizar a los estudiantes con un sistema de cultivo celular sencillo y fiable. Los estudiantes se iniciarán en los principios básicos del cultivo celular y examinarán el crecimiento celular y determinarán la viabilidad de las células de insecto Sf9.

2. MATERIAL Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Componentes	Envío	Conservación
Células de insecto (Sf9).	3 viales	T.A.
Medio de cultivo de las células de insecto (A).	125 ml	4 °C
Tampón Fosfato Salino (PBS 1x).	30 ml	4 °C
Colorante azul de tripano.	1 ml	T ^a ambiente
Frasco cultivo celular (estériles, 25 cm²)	3 unid	
Placas de cultivo celular (estériles, 35 mm)	30 unid	
Pipetas de 10 ml (estériles)	18 unid	
Pipetas pasteur (estériles)	70 unid	
Rascadores (estériles)	3 unid	
Cámaras de recuento celular	6 unid	
Tubos de fondo cónico de 15 ml (estériles)	18 unid	
Tubos de fondo cónico de 50 ml (estériles)	6 unid	
Tubo de centrifuga de 1,5 ml	90 unid	

Esta práctica está diseñada para que la realicen 6 grupos de estudiantes. Contiene los reactivos y materiales suficientes para desarrollarla con éxito.

NOTA: Las células de insecto Sf9 se deben solicitar un mínimo de 2 semanas antes de la fecha prevista para empezar el experimento. Las células de insecto se han de **cultivar inmediatamente** después de su recepción (ver protocolo anexo 3).

NOTA: El **Medio de cultivo de las células de insecto** y el **Tampón fosfato salino (PBS)** se deben almacenar inmediatamente en nevera (4°C) después de su recepción.

Todos los componentes de esta práctica están destinados únicamente a la investigación educativa. No deben usarse para fines diagnósticos o farmacológicos, ni para ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material necesario y no incluido en este kit

- Cámara de incubación. En caso de no disponer, usar un recipiente grande con cubierta de plástico o caja de cartón con tapa (la caja DANAGEN que contiene los materiales del kit, puede utilizarse como cámara de incubación).
- Etanol al 70% en botellas de aerosol.
- Pipeta con pera de succión o pipeta automática.
- Microscopio invertido de contraste de fases / campo brillante (las células se pueden ver con un microscopio de estudiante en posición vertical, pero está limitado por la altura de las placas de cultivo).
- Micropipeta de 10-1000 μ l y puntas.
- Rotuladores marcadores.
- Gafas de seguridad, mascarilla (opcional), guantes de laboratorio desechables y batas de laboratorio.
- Contenedores de residuos (vasos de precipitado).

NOTA: El microscopio invertido se utiliza para la observación de las células en cultivo (en frasco o en placa). Para la observación y contaje de las células en la cámara de recuento celular, utilizar el microscopio de estudiante (posición vertical).

3. INTRODUCCIÓN

El cultivo de células eucarióticas

El cultivo celular, la capacidad de crecer y estudiar bacterias, virus y células eucariotas, es una piedra angular de la biología moderna. En experimentos de cultivos celulares, los científicos recrean en un laboratorio el ambiente natural de las células para responder a importantes preguntas biológicas. Esto puede incluir estudios que examinen la estructura, el comportamiento o la enfermedad de las células. El cultivo celular ha aumentado la comprensión de las funciones celulares y se ha convertido en una plataforma importante para el estudio tanto del desarrollo normal como de las enfermedades de las células.

Aunque los científicos realizaron los primeros experimentos de cultivo celular a mediados de 1800, las técnicas no se desarrollaron realmente hasta el siglo XX. Desde entonces, el cultivo celular ha permitido que células de docenas de especies sean cultivadas y estudiadas. Uno de los primeros de estos experimentos implicó preparaciones brutas de tejidos que se colocaron en una solución tampón. Muchos de los ensayos iniciales de cultivos celulares no tuvieron éxito, e incluso los estudios más prometedores sólo pudieron mantener las células vivas durante unos días. Afortunadamente, mediante el uso de reactivos y técnicas mejoradas, ahora es posible cultivar células durante meses, años e incluso décadas. Se han seleccionado cultivos de células, cuyo ADN contiene numerosas mutaciones que les permiten crecer por tiempo indefinido, produciendo las llamadas *líneas celulares inmortalizadas*.

El cultivo celular ha dado lugar a avances en los campos de la ciencia de la vida, la biotecnología y la investigación farmacéutica. Por ejemplo, la investigación inicial de vacunas dependió en gran medida del uso de animales para pruebas y producción de virus. Sin embargo, el desarrollo de cepas de cultivo celular, ha permitido su desarrollo sin necesidad de utilizar animales vivos. Además de reducir las pruebas en animales, el cultivo celular ha aumentado la reproducibilidad y ha reducido los costos asociados con la producción de vacunas. El cultivo celular también se usa para estudiar muchas enfermedades comunes, incluyendo trastornos genéticos, infecciones virales y bacterianas y cáncer. Estos experimentos permiten examinar las células sanas y enfermas, monitorear los efectos de la adición o de la supresión de genes o detectar terapias eficaces.

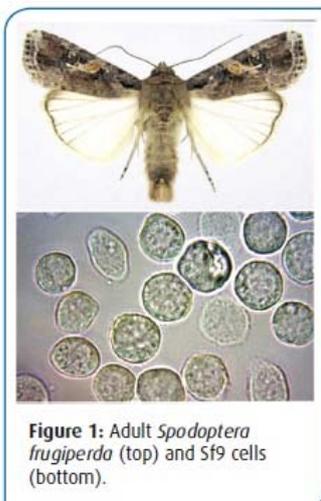


Figure 1: Adult *Spodoptera frugiperda* (top) and Sf9 cells (bottom).

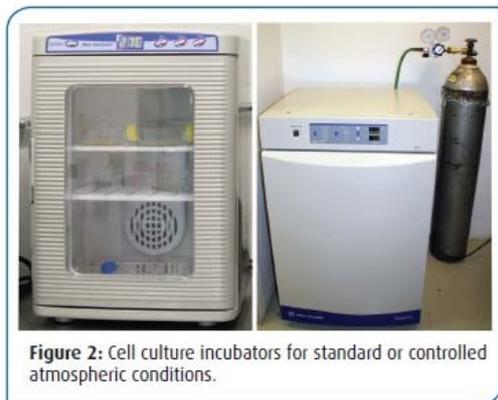
El cultivo de células de insectos Sf9

El cultivo de células de insectos se originó como un enfoque para mejorar la comprensión de la biología de los insectos. Muchos de los primeros estudios con células de insectos fueron diseñados para analizar cuestiones biológicas básicas. Estos experimentos proporcionaron información valiosa sobre el desarrollo y la

patología de los insectos. Además, se ha utilizado el cultivo de células de insectos para desarrollar nuevos insecticidas y otros elementos disuasivos contra las plagas agrícolas. Una de las más populares de estas cepas de insectos ha sido la línea celular Sf9, que se derivó de las células ováricas del gusano común de la caída, *Spodopterafrugiperda* (palomilla del maíz) (Figura 1).

Las células Sf9 son un modelo importante para examinar los procesos celulares básicos, muchos de los cuales están presentes en los eucariotas superiores.

Es importante destacar que las células Sf9 crecen rápidamente y son fáciles de mantener. Las células se cultivan en atmósfera estándar y a temperatura ambiente,



a diferencia del cultivo de células de mamífero que requiere incubadoras complicadas para controlar la temperatura, el CO₂ y la humedad (Figura 2). Estos rasgos simplifican las condiciones de crecimiento y reducen el costo de cultivar las células. La facilidad de crecimiento de las células Sf9 las ha convertido en una parte esencial de la industria biotecnológica, donde las células se utilizan comúnmente en la

producción de proteínas y virus recombinantes. Es importante destacar que la sencillez del cultivo, hace de las células de insectos un modelo útil para el aula.

Técnicas de cultivo celular

Se han desarrollado muchas herramientas y técnicas para mantener células cultivadas. Por ejemplo, los investigadores utilizan frascos estériles y placas que han sido tratadas para permitir que las células se adhieran y crezcan. La mayoría de las líneas celulares no humanas no son patógenas y se pueden manipular en campanas de cultivo estándar. Estas campanas ayudan a prevenir la contaminación de las células por bacterias, hongos, levaduras y moho, pero no están diseñadas para proteger al científico (Figura 3). Por el contrario, las células



infecciosas y los virus pueden requerir el uso de equipos con niveles elevados de protección personal, campanas de cultivo específicas e incluso salas e instalaciones especializadas. Las condiciones estériles se mantienen descontaminando todas las superficies y equipos con etanol, y usando pipetas "de barrera" que contienen un filtro.

Las células se cultivan en un medio de crecimiento cuya solución, químicamente compleja, proporciona los nutrientes necesarios para que las células crezcan. Los medios contienen típicamente aminoácidos esenciales, tampones, sales y una fuente de carbono como la glucosa. Esta mezcla se equilibra cuidadosamente para su uso con líneas celulares específicas y la elección de los medios es esencial para el crecimiento y el comportamiento adecuados. Muchas líneas celulares se suplementan con suero animal, para proporcionar factores esenciales de crecimiento, y antibióticos, para ayudar a reducir las posibilidades de infección bacteriana.

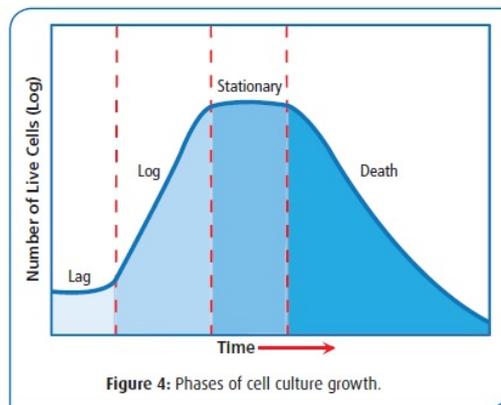
El medio celular de insectos proporcionado para esta práctica contiene suero y antibióticos, que se conoce como un medio completo.

Muchas características celulares son visibles usando un microscopio compuesto modesto. El uso de tinciones especiales, disponibles para acentuar las estructuras celulares, mejoran las observaciones. Por ejemplo, el azul de tripano, un colorante vital, se utiliza comúnmente para aumentar el recuento de células y para controlar la salud y la tasa de crecimiento de células cultivadas. El azul de tripano no teñirá las células vivas, pero es rápidamente absorbido por las células muertas. Por lo tanto, cuando una mezcla de células se trata con azul de tripano sólo las células muertas se teñirán de color azul. Otros colorantes, como el colorante de Giemsa, pueden usarse para examinar la estructura celular, las etapas del ciclo celular o para distinguir entre múltiples tipos de células dentro de una población. El colorante Giemsa teñirá el ADN de las células Sf9 azul oscuro, mientras que el citoplasma se teñirá de color azul claro o morado. Se pueden usar colorantes adicionales para identificar células específicas o características con diferentes colores, lo que permite a un patólogo diferenciar entre tipos de células presentes en una mezcla.

Crecimiento y mantenimiento de las células cultivadas

En el cultivo celular, las células Sf9 se immortalizan, lo que les permite proliferar durante muchas generaciones en condiciones óptimas. Las células continuarán dividiéndose en un frasco de cultivo hasta que se agoten los nutrientes esenciales que contiene el medio de crecimiento o cuando hayan ocupado todo el espacio disponible (confluencia del 100%). En este último caso, el crecimiento de las células se inhibe por contacto y, como consecuencia, dejarán de dividirse. Cuando esto ocurre, es necesario diluir las células (disminuir la densidad celular) y cultivarlas en otro frasco. La operación es sencilla, se debe retirar una pequeña población de células y transferirla a un nuevo frasco que contenga un medio nuevo con los nutrientes necesarios. Una vez realizado este procedimiento, las células volverán a proliferar y a promover su crecimiento, pasando por tres fases distintas (Figura 4).

- ***Fase de latencia:*** Inmediatamente después de que las células se han pasado a un frasco nuevo, pueden entrar en una fase de latencia del crecimiento donde hay poco aumento del número de células. Durante este tiempo, las células "condicionan" los medios secretando proteínas que estimulan el crecimiento. La densidad celular es baja, con células que cubren menos de 50% de la superficie (*confluentes al 50% o bien*



pasado a un frasco nuevo, pueden entrar en una fase de latencia del crecimiento donde hay poco aumento del número de células. Durante este tiempo, las células "condicionan" los medios secretando proteínas que estimulan el crecimiento. La densidad celular es baja, con células que cubren menos de 50% de la superficie (*confluentes al 50% o bien*

50% de confluencia, ver figura 8). La fase de latencia puede durar alrededor de 1-2 días.

- ***Fase de crecimiento (o exponencial):*** Durante esta fase, el número de células aumenta de forma exponencial y el crecimiento celular continuará siempre y cuando haya suficientes nutrientes para mantener el número de células en crecimiento. Las células son confluentes al 50-80%, aproximadamente.

- ***Fase estacionaria:*** Durante esta fase, el número de células permanece constante, ya que algunas células mueren y otras se dividen lentamente. Eventualmente, todas las células morirán a menos que se agregue un medio de cultivo fresco. En este punto, las células son confluentes al 90-100%.

Las fases del crecimiento celular pueden estimarse examinando la confluencia del cultivo. Para una medición más precisa, los científicos determinan la tasa de crecimiento de las células mediante la repetición del recuento de células durante unas pocas horas o días. Los cambios en la tasa de crecimiento de las células podrían indicar un problema con la salud del cultivo que no es inmediatamente evidente.

El futuro de la investigación sobre los cultivos celulares

Los experimentos en cultivos celulares son esenciales tanto para la investigación académica como la industrial. Los científicos usan rutinariamente líneas celulares para responder a preguntas sobre el comportamiento de células, tejidos e incluso organismos enteros. Por ejemplo, el cultivo celular ha mejorado nuestra comprensión de la evolución, de la función celular y del comportamiento, y el desarrollo temprano en los animales. Así mismo, estos experimentos son valiosos para examinar el ADN, el ARN y la función de las proteínas a nivel celular.

El cultivo celular se utiliza comúnmente para desarrollar y detectar fármacos potenciales, permitiendo el desarrollo rápido de terapias novedosas. En estos experimentos los científicos cultivan células sanas y

enfermas para comprender la naturaleza biológica de la enfermedad y descubrir tratamientos eficaces para los pacientes que la padecen.

Otras aplicaciones del cultivo celular incluyen la investigación de células madre, el trasplante de órganos, la terapia génica y la investigación neurológica. La utilización de cultivos celulares es importante para reducir el uso de animales en investigación. La investigación futura continuará mejorando nuestra comprensión de las funciones celulares y la salud humana.

En esta práctica, los estudiantes desarrollarán habilidades en la manipulación y mantenimiento de células de insecto Sf9. Los grupos de estudiantes han de cultivar las células utilizando técnicas estériles. Las células se han de examinar por microscopía para determinar la morfología celular, la tasa de crecimiento y la viabilidad. Usando los datos que recogen, los estudiantes han de crear y analizar una curva de crecimiento.

4. PRÁCTICA

A. Consideraciones Generales

El cultivo exitoso de las células depende de que estas se mantengan en un entorno libre de contaminación por microorganismos tales como bacterias, hongos y virus. Todos los materiales que entran en contacto con el cultivo celular ***deben estar desinfectados previamente con el objetivo de que las manipulaciones no permitan*** que el entorno no estéril pueda contaminar el cultivo. Para ello es muy importante:

1. Utilizar batas de laboratorio y mascarillas. Su uso minimiza el riesgo de contaminación de los cultivos celulares. El pelo largo debe mantenerse atado y evitar hablar en lo posible durante el tiempo de duración de la manipulación de los cultivos celulares.

2. Usar guantes desechables en todo momento. Previamente a su utilización, **ROCIAR** los guantes desechables con etanol al 70% y frotar ambos guantes para desinfectarlos (en especial la zona interdigital). Este paso se debe realizar con frecuencia mientras se trabaja con las células para evitar la contaminación. Siempre que creamos haber tocado cualquier zona no estéril, ante la duda, **cambiar** los guantes y **desinfectar** inmediatamente el nuevo par con etanol al 70%.

B. Área de trabajo. Material necesario

Antes de empezar a manipular el cultivo debemos de tener en cuenta la siguiente metodología:

1. **ESTERILIZAR** con etanol al 70% todas las superficies de la poyata de trabajo utilizando una toalla de papel limpia.

2. **DISPONER PREVIAMENTE** de todo el material necesario y limpiarlo con etanol al 70%.

3. **ORGANIZAR** el área de trabajo (a) para tener fácil acceso a todo el material que vamos a utilizar, con el mínimo de manipulación posible para alcanzar el que necesitamos y (b) dejar un espacio amplio y claro en la zona del centro de la poyata en el que podamos trabajar, evitando el contacto con el resto de material que no vamos a utilizar en ese momento. Si tenemos demasiadas cosas cerca de nosotros, inevitablemente podemos tocar o rozar la punta de una pipeta estéril contra una superficie no estéril y contaminar nuestro cultivo.

4. Al finalizar un procedimiento específico, **RETIRAR** las soluciones y equipos innecesarios del área de trabajo, manteniendo sólo los materiales que sean necesarios para los próximos pasos y que han sido limpiados con alcohol al 70%.

C. Pipeteo

El momento de manipular las pipetas para el uso de líquidos, es una de las acciones más comunes en las que se contaminan los cultivos celulares y/o los medios de cultivo. Para evitarlo, debemos:

1. **TRANSFERIR** grandes volúmenes de líquidos utilizando pipetas de plástico estériles desechables (10 ml o 25 ml) junto con dispensadores de pipetas o peras de succión portátiles de pipeta, ya sea motorizadas o manuales. Sujetar la pera de pipeta cómodamente para permitir la operación con una sola mano.

2. **TRABAJAR** sólo dentro del rango de visión y asegurarse que la pipeta está en su línea de visión continuamente y no oculta por su brazo. Asegurarse que la pipeta esté inclinada hacia usted, o hacia un lado, de modo que ninguna mano quede sobre una botella o frasco abiertos.

3. **TRANSFERIR** pequeños volúmenes con pipetas pasteur de transferencia, estériles. Estas deben de ser retiradas de su cubierta protectora de plástico, en una zona estéril (bajo la campana) e inmediatamente antes de su uso.

4. **LIMPIAR** inmediatamente cualquier derrame intentando no ampliar la zona afectada y a continuación volver limpiar el área de trabajo con etanol 70% para reducir la contaminación.

D. Botellas y frascos

1. Las botellas deben estar verticales cuando están abiertas, evitando el riesgo de derrame del líquido que las contienen. No dejar los frascos de reactivos/medios abiertos y no trabajar justo por encima de una botella o frasco abierto.

2. Los frascos que contienen el cultivo celular deben colocarse horizontalmente cuando están abiertos y mantenerse en ángulo durante las manipulaciones. Cuando se necesite aspirar medio de cultivo contenido en la botella, esta debe de permanecer inclinada, reduciendo la contaminación (Figura 6).

3. **EVITAR** el vertido desde un contenedor estéril a otro a menos que la botella de la que vaya a verter se use sólo una vez y vacíe todo su contenido en la transferencia. El procedimiento del vertido, provoca la formación de un puente de líquido entre el interior y el exterior de la botella, lo que podría causar contaminación.



E. Uso de las cámaras de incubación

Los incubadores de cultivos celulares, son ampliamente utilizados en microbiología y biología celular para cultivar bacterias y células eucariotas. Estos incubadores mantienen el control de temperatura, humedad y otras condiciones tales como la concentración de dióxido de carbono y de oxígeno en la atmósfera interior.

La ventaja de trabajar con células de insecto Sf9 es que pueden crecer a temperatura ambiente y no requieren un entorno de crecimiento complicado. En el caso de que en el laboratorio exista un incubador, este se puede ajustar para mantener una temperatura de 27°C.

Antes de comenzar el experimento, todas las superficies existentes alrededor de la zona de trabajo deben limpiarse con etanol 70% para desinfectarlas. Si no dispone de un incubador, se puede utilizar una caja de cartón de tamaño apropiado (como la caja que contiene el material del kit DANAGEN) o bien un recipiente de plástico con tapa (Figura 5). Se puede usar un único contenedor para almacenar los frascos de todos los grupos de la clase (debidamente rotulados para reconocer el grupo al que pertenecen).

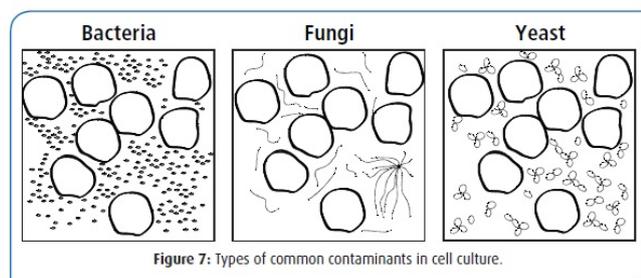
Debemos tener en cuenta que:

1. Las células de insectos prefieren crecer en un ambiente oscuro y no crecerán bajo luz directa. En caso de ser necesario, **CUBRIR** la cámara de incubación con papel de aluminio para evitar la luz.
2. Tenemos que **LIMPIAR** el interior de la cámara de incubación con etanol al 70% y dejar que las superficies se sequen completamente.
3. Hay que **COLOCAR** la cámara en un área libre de corrientes de aire que mantenga una temperatura entre 24-27°C. **Evitar** ventanas o respiraderos que puedan alterar la temperatura de la cámara y, además, que faciliten la contaminación del cultivo.

F. Contaminaciones

La observación microscópica puede revelar la fuente de contaminación en el cultivo celular (Figura 7).

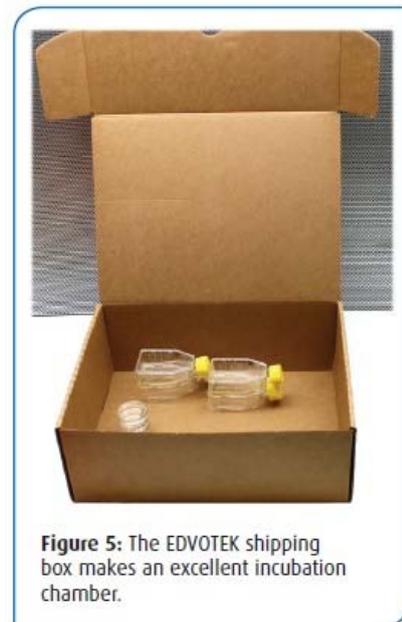
- **Bacterias**: los medios parecen nublados y pueden tener una película blanca en la superficie. Bajo el microscopio se verán células pequeñas y granulares, como puntos negros.



- **Hongos**: en el medio de cultivo, aparecen micelios filamentosos delgados que cubren el cultivo celular, como un crecimiento borroso (típicamente blanco o negro). También es visible a simple vista.

- **Levadura**: partículas redondas que son más pequeñas que las células de insectos. Normalmente se observan cadenas de dos o más células.

NOTA: Si se observa la presencia de contaminación, **es importante** eliminar, rápidamente y con seguridad, los reactivos y las placas



contaminadas para prevenir la propagación de la contaminación. Revisar si se ha aplicado la técnica estéril adecuadamente y analizar las posibles fuentes de contaminación. **Recordar** que antes de empezar la práctica, es necesario desinfectar el área de trabajo y todos los materiales que serán utilizados, incluyendo los guantes. Minimizar el tiempo en el que los recipientes están abiertos al aire y asegurarse que la pipeta no entre en contacto con ninguna otra superficie que no sea el soporte y la placa de cultivo celular.

La práctica se dividirá en 3 módulos:

- **Módulo I:** *Observación y evaluación del estado celular.*
En este módulo los estudiantes aprenderán a observar las células de insecto en el microscopio y determinar si están creciendo en condiciones óptimas. También podrán conocer cuándo es el mejor momento para hacer los subcultivos o bien para cambiar el medio de cultivo por uno nuevo que contiene los nutrientes esenciales necesarios. Normalmente, las células deben alimentarse cada 3-5 días y resembrar (subcultivo) cada 10 días, preferentemente cuando existe una confluencia del 80-90%.
- **Módulo II:** *Manipulación del cultivo de células de insecto.*
En este módulo los estudiantes aprenderán a mantener un cultivo celular aplicando, en todo momento, la técnica de asepsia (**Módulo I**). Las células de insectos cultivadas requieren una fuente de nutrientes determinada, presentes en el medio de cultivo, que les permite crecer y dividirse. Con el tiempo, las células agotan los nutrientes y factores de crecimiento del medio y requiere que estos sean renovados. Además, los medios de cultivo acumulan productos de desecho tóxicos derivados de la actividad celular. El cultivo celular que se mantiene en estas condiciones finalmente morirá, para evitarlo es necesario cambiar regularmente los medios para mantener un cultivo sano.
- **Módulo III:** *Viabilidad y Cinética del crecimiento celular.*
En este apartado los estudiantes aprenderán a realizar recuentos de células vivas y muertas, así como calcular la viabilidad del cultivo. El recuento de células se hace mediante una cámara de especial de recuento de células (cámara de Neubauer) o hemocitómetro, un dispositivo ampliamente utilizado para el recuento de células presentes en un volumen específico de fluido. Además, también se puede usar para distinguir las células vivas de las muestras, con la ayuda de un colorante. Las células vivas excluyen el colorante, mientras que las muertas lo incorporan, tiñéndose con el colorante utilizado.

Módulo I: Observación y evaluación del estado celular

MATERIAL NECESARIO

Para la realización de esta práctica, es necesario disponer de los siguientes materiales antes de su inicio:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles de 10 ml	

GENERALIDADES

Es importante examinar las células de insectos antes de cada experimento de cultivo celular para asegurar que estén sanas y libres de contaminación (condiciones óptimas). Las células insalubres y apoptóticas mostrarán un aumento de las partículas pequeñas (denominadas gránulos), la formación de vacuolas, la contracción celular, la aparición del fenómeno de *blebbing* en la membrana celular (formación de pequeñas burbujas en los bordes de las células) y la fragmentación del núcleo (Figura 8A).

METODOLOGÍA

1. **RECUPERAR** un frasco de células de la incubadora de cultivo celular y llevarlo a la zona de trabajo del laboratorio. Recordar mantener la zona limpia mediante la aplicación de alcohol al 70%.

2. **COMPROBAR** que el medio está limpio y transparente. Las células de los insectos deben ser visibles como una neblina pálida o un grupo de células en la superficie inferior del frasco y el medio en el interior del frasco debe ser claro. Un medio de cultivo de células turbias indica contaminación microbiana.

3. **EXAMINAR** las células bajo un microscopio. Buscar signos de células enfermas que

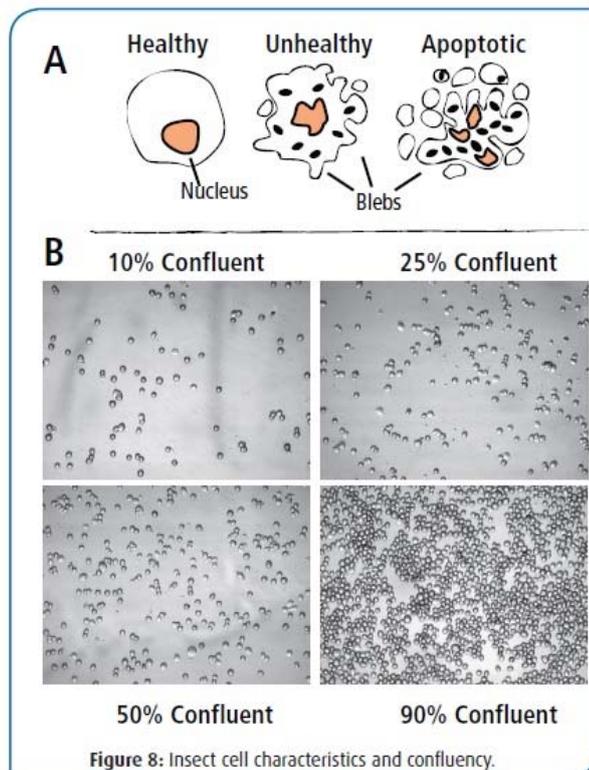


Figure 8: Insect cell characteristics and confluency.

podrían indicar que en los medios celulares ha disminuido drásticamente la cantidad de nutrientes y necesitan que sean cambiados o bien que las células sean subcultivadas si la confluencia es superior al 80%.

NOTA: Si el cultivo de células está contaminado, añadir inmediatamente al frasco 1 ml de solución de lejía al 10%. Después de una hora, como mínimo, desechar el cultivo. Limpiar la incubadora de cultivos celulares con etanol 70% para prevenir la propagación de la contaminación.

4. **ANOTAR** en el registro de datos: el aspecto de las células, la claridad del medio y la presencia o la ausencia de contaminación. **DIBUJAR** una imagen de la morfología celular, incluyendo la forma de las células individuales y el tamaño y distribución de los grupos de células.

NOTA: Si es posible, tomar fotografías con una cámara digital, imprimirlas e incluirlas en el registro de datos del cultivo celular

5. **DETERMINAR** si las células requieren tiempo adicional para crecer y necesitan ser alimentadas o bien llegan al 80%-90% de confluencia y necesitan ser amplificadas (repartirlas en otras placas para obtener más células). Seguir las instrucciones del módulo III.

6. Si las células no están listas para ser amplificadas, **VOLVER** a colocar el frasco en la incubadora. Revisar las células diariamente para monitorear el crecimiento, registrando los datos en el registro de datos de cultivo celular. Observar cualquier cambio en la morfología celular a medida que las células aumentan de confluencia.

Módulo II: Manipulación del cultivo de células de insecto

MATERIAL NECESARIO

Para la realización de esta práctica, es necesario disponer de los siguientes materiales antes de su inicio:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	<input type="checkbox"/> Medio de cultivo de células de insecto
<input type="checkbox"/> Dosificador/pera de pipetas	<input type="checkbox"/> Placa de cultivo celular de 35mm
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles de 10 ml	<input type="checkbox"/> Rascadores de placas
<input type="checkbox"/> Pipetas de volumen variable	<input type="checkbox"/> Puntas de pipeta (estériles)
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles pasteur	<input type="checkbox"/> Cámara de conteo de células (Neubauer)
<input type="checkbox"/> Tubo estéril de 15 ml	

GENERALIDADES

Las células de insecto se pueden mantener vivas durante largos períodos de tiempo sin que la degeneración del ADN afecte a la fisiología y viabilidad celular.

Para obtener un número de células elevado que nos permita realizar los experimentos que deseamos, debemos alimentarlas y repartirlas en nuevos cultivos (proceso denominado como **pases del cultivo o resiembra**).

Los nutrientes básicos que permiten el óptimo crecimiento celular se agotan a lo largo de los días de cultivo, por lo que se deben de reponer. Esto implica **reemplazar el medio de cultivo antiguo por un medio de cultivo fresco**.

La resiembra o subcultivo es el proceso que se realiza para la obtención de un mayor número de células. Requiere de separar una cantidad determinada de células y repartirlas en diferentes frascos de cultivo (**pases**). En la mayoría de cultivos, dicho proceso se lleva a cabo cuando la confluencia celular supera el 80%.

SUSTITUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El reemplazo del medio de cultivo, debe realizarse cada 2-3 días. La necesidad de cambiar el medio, vendrá indicada por la observación microscópica del estado del cultivo.

Una vez que tenemos desinfectada la zona de trabajo y el material necesario que utilizaremos (ver Módulo I), procedemos a:

1. **RECUPERAR** el tubo de **Medio de cultivo para las células de insecto** que tenemos en la nevera (a 4°C) y dejar que se atempere a temperatura ambiente antes de usarlo.
2. **RETIRAR** 4 ml del medio del frasco que contiene el frasco de las células en cultivo, utilizando una pipeta pasteur estéril y aspirando suavemente. Tener cuidado de que la pipeta no contacte con la superficie del frasco a la cual están adheridas las células (se puede mantener un pequeño volumen del medio antiguo, ya que contiene factores de crecimiento que ha sido secretado por las células).
3. **DESECHAR** el medio retirado del frasco en un recipiente de desecho (vaso de precipitado) asignado para este propósito.
4. **AÑADIR 4 ml** de medio de cultivo para células de insecto fresco usando una pipeta pasteur estéril nueva. La pipeta utilizada para aspirar el medio antiguo no puede entrar en contacto con el medio fresco nuevo.
5. **VOLVER** a depositar el frasco con las células de insecto en la cámara de incubación durante el tiempo que sea necesario antes de realizar un nuevo cambio de medio de cultivo. Es necesario **observar** el cultivo celular a diario, bajo el microscopio, y determinar su estado. Si el cultivo requiere del reemplazo de nutrientes, cambiar el medio de cultivo por uno fresco y en el caso de que la confluencia del crecimiento celular sea superior al 80%, amplificar el cultivo de células (realizar un pase del cultivo).

AMPLIFICACIÓN DEL CULTIVO CELULAR (PASES DEL CULTIVO CELULAR, SUBCULTIVO O RESIEMBRA)

Las células pueden seguir creciendo de forma continuada, sin que se produzca la muerte celular. Para ello, es necesario ir haciendo sucesivos pases o amplificaciones del cultivo de células.

Cuando las células llegan a una confluencia del 80-90% ya están listas para realizar este proceso. Si las dejáramos crecer hasta una confluencia del 100% y estuvieran mucho tiempo bajo estas condiciones, se produciría una inhibición por contacto entre las células y por tanto dejarían de crecer y entrarían en el proceso de senescencia que conduciría a la muerte celular.

Una vez que tenemos desinfectada la zona de trabajo y preparado el material necesario que utilizaremos (ver Módulo I), procedemos a:

1. Con ayuda del **rascador estéril** y con cuidado de que este no toque el exterior del frasco, **FROTAR** suavemente la superficie, en la cual se encuentran adheridas las células, durante repetidas veces.

2. Usando una pipeta estéril de 10 ml y un dispensador de pipetas (pera de succión para la pipeta), **PIPETEAR** la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo varias veces contra la superficie del frasco a la cual están adheridas las células. Este proceso ayuda a dispersarlas y a que no formen agregados celulares, facilitando un crecimiento uniforme en las placas siguientes.

Este procedimiento debe realizarse con suavidad y sin aspirar aire para **EVITAR** la formación de espuma.

3. Utilizar un microscopio para **CONFIRMAR** el desprendimiento de las células de insecto de la parte interior del frasco.

3.A. Preparación del cultivo para la realización de la práctica correspondientes al Módulo III

Para el desarrollo de las prácticas correspondientes al Módulo III, necesitamos un total de 5 placas nuevas de cultivo celular de 35 mm.

Etiquetar las placas con las iniciales de la identificación del grupo de estudiantes correspondiente. **Marcar** 5 placas con la etiqueta de Módulo III.

IMPORTANTE: Para el desarrollo de estas prácticas, añadiremos de 0,075 a 0,1 millones de células en cada placa de cultivo.

Utilizaremos un total de 5 placas de cultivo para realizar las prácticas del Módulo III, por lo tanto, en el caso de que decidamos sembrar 0,075 millones de células por placa, para un total de 5 placas X 0,075 millones/placa, **necesitaremos un total de 0,375 millones de células.**

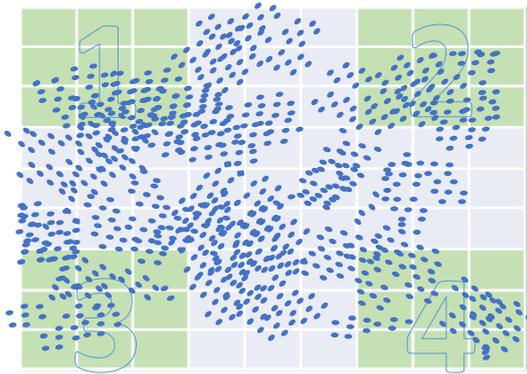
Protocolo para la obtención de la densidad celular deseada:

Necesitamos **CONTAR** el número de células presentes en el homogenado obtenido en el apartado anterior:

1. **Añadir** 15 μ l en la pestaña de una de las 10 áreas de la cámara de conteo de células (cámara de Neubauer).

2. **Contar** el número de células presentes en cada una de las 9 zonas de conteo (cada una de ellas contiene un total de 9 cuadrados).

Como alternativa igualmente representativa, también se puede contar el número de células presentes en cada una de las zonas presentes en las esquinas del cuadrado 3x3 de la cámara de Neubauer.



Si contamos las cuatro zonas: 1, 2, 3 y 4, entonces el número de células promedio sería:

Número promedio = número total de células contadas / Número de zonas de conteo utilizadas.

Si utilizamos las 4 esquinas, el número promedio = número de células contadas / 4

La fórmula para determinar el número de células presente en el cultivo es la siguiente:

n° células totales presentes en 1ml (densidad celular) = n° células promedio x factor de multiplicación x factor de dilución.

Factor de multiplicación = 4500.

Factor de dilución = 1 (en este caso, no hemos diluido las células antes de depositarlas en la cámara de conteo).

El valor obtenido es el número de células por mililitro. Nuestro **homogenado celular** está en un volumen de medio de cultivo de 4 ml.

NOTA:

Para conocer el número total de células en la placa, debemos de realizar la siguiente operación:

$$\text{n° células totales en placa} = \text{n° células contadas} / 1 \text{ ml} \times 4 \text{ ml}$$

3. **Diluir** el homogenado de células **en un tubo estéril de 15 ml**, hasta llevarlas a una densidad de 0,075 millones / ml.

Por ejemplo, si en nuestro cultivo hemos obtenido una densidad celular de 0,8 M / ml, para llevarla a una densidad de 0,075 M / ml, que sembraremos en cada una de las placas de 35 mm, debemos de conocer el factor de dilución para obtener la densidad deseada

$$0,8 \text{ M/ml} : 0,075 \text{ M/ml} \sim 10,6$$

Significa que, para diluir la densidad inicial de la que partimos y obtener la densidad a la que plantaremos las células en las placas de 35 mm, tenemos que **trasladar** 1 ml de células del cultivo a un tubo estéril de 15 ml y **añadir**, con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml, 9,6 ml de medio de cultivo de células hasta llevarlas a un volumen total de 10,6 ml.

4. **Añadir**, con ayuda de una pipeta pasteur estéril, 1 ml de medio de cultivo fresco a cada una de las placas de 35 mm, previamente identificadas.

5. **Añadir**, con ayuda de una pipeta pasteur estéril, 1 ml del homogenado de células, $\delta=0,075M/ml$, a cada una de las placas de cultivo.

Precaución: Antes de añadir las células, con la ayuda de la pipeta pasteur estéril, resuspender suavemente el homogenado.

6. **Mover** con suavidad cada una de las placas hacia adelante y hacia atrás, dibujando una cruz, para **distribuir** uniformemente las células presentes en la placa.

7. **Examinar** las células bajo el microscopio y **confirmar** la presencia de células en las placas y que las células son redondas y claras, no marchitas ni oscuras.

NOTA: Las células que no utilizamos pueden ser eliminadas, añadiendo 1 ml de lejía al 10% al tubo de 15 ml en el que se encuentra el homogenado. Después de 1 hora de haber añadido la lejía, como mínimo, se puede desechar.

8. **Anotar** los datos observados en el registro de datos de cultivo celular.

9. Después de 24 horas de añadir las células a las placas, deberían de haberse adherido a su superficie. **Confirmar**, bajo el microscopio, la fijación de las células.

Las placas de células serán utilizadas para el desarrollo de la práctica correspondiente al Módulo III.

NOTA: Si las prácticas de laboratorio se realizan cada día, la densidad celular utilizada en cada placa de cultivo debe de ser de unas 100000 células.

Módulo III: Viabilidad y Cinética del crecimiento celular

MATERIAL NECESARIO

Para la realización de esta práctica, es necesario disponer de los siguientes materiales antes de su inicio:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	<input type="checkbox"/> Tampón fosfato (PBS 1x)
<input type="checkbox"/> Azul de tripano	<input type="checkbox"/> Rascadores de placas
<input type="checkbox"/> Pipetas de volumen variable	<input type="checkbox"/> Puntas de pipeta (estériles)
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles pasteur	<input type="checkbox"/> Tubos de microcentrifuga

La viabilidad celular la determinaremos mediante la relación existente entre el número de células viables -células vivas presentes en el cultivo celular- y el número total de células, obtenidas de la suma del número de células viables y el número de células no viables.

Los datos obtenidos cada día, durante diferentes días, tanto del número de **células viables** como del número de **células no viables**, los utilizaremos para determinar la cinética del crecimiento de las células de insecto a lo largo del cultivo.

DISCRIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS VIABLES Y LAS NO VIABLES

Para poder distinguir las células viables (vivas) de las no viables (muertas) y obtener la cantidad presente en el cultivo celular de cada una de ellas, necesitamos identificarlas.

En esta práctica utilizaremos el azul de tripano, un colorante que penetra a través de las membranas de las células no viables tiñéndolas de un color azul intenso. Las células viables no incorporan el colorante y por lo tanto no presentan el color azul.

Una vez que discriminamos unas células de las otras, **podremos establecer el número presente de cada una de ellas en el cultivo**.

Protocolo de tinción celular con el colorante azul de tripano:

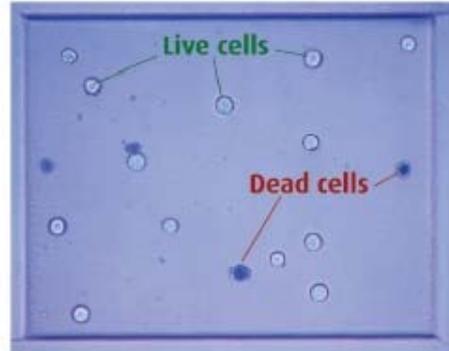
La aplicación de este protocolo no requiere de la utilización de material estéril, por lo que podemos realizarlo en la poyata limpia y con espacio suficiente, en la que previamente hemos dispuesto el material necesario.

1. **RECUPERAR**, a las 24 horas del cultivo, una de las placas de 35 mm correspondiente al Módulo III. **Identificar** la placa como día 1 y **anotar** la confluencia en el registro de datos del cultivo celular.
2. Con ayuda del rascador, **RASCAR** suavemente la placa del cultivo celular asegurándonos que llegamos con el rascador a toda la superficie sobre la que se encuentran las células adheridas.
3. **PIPETEAR** suavemente las células arriba y abajo tres veces con ayuda de una pipeta pasteur para dispersar el cultivo.
4. **IDENTIFICAR** dos tubos eppendorf con el nombre del grupo de estudiantes y **AÑADIR** 1 ml del homogenado celular en cada uno de los tubos.
5. **CENTRIFUGAR** los tubos a 1000 rpm durante 5 minutos.
6. **ASPIRAR** el sobrenadante (medio de cultivo) con ayuda de una pipeta de volumen variable y **EVITAR** que se aspiren las células presentes.
7. **AÑADIR** 500µl de tampón fosfato (PBS 1x) a cada uno de los dos tubos de microcentrífugas con ayuda de la pipeta de volumen ajustable y, **suavemente**, resuspender las células, **evitando** la formación de espuma.
8. **AÑADIR** a uno de los tubos de microcentrífuga los 500 µl del homogenado celular presente en el otro tubo de microcentrífuga. Ahora tendremos un único tubo de microcentrífuga con un volumen de 1 ml de la suspensión celular.
9. **TRANSFERIR** 10 µl de colorante azul de tripano en un tubo de microcentrífuga. **AÑADIR** 10 µl de la suspensión celular y con la misma punta de la pipeta de volumen ajustable, pipetear el volumen arriba y abajo repetidas veces para que la suspensión celular sea homogénea. Hemos diluido el volumen 2 veces. Factor de dilución = 2.
10. **INCUBAR** las células del tubo durante 1 minuto a temperatura ambiente.
11. **TRANSFERIR** lentamente 12 µl (aproximadamente una gota) de la suspensión de células teñidas de azul de tripano a una muesca situada en el lado superior central de una cámara de recuento de las diez que contiene cada portaobjetos de recuento de células. La cámara se llenará por acción capilar.
12. **EXAMINAR** la cámara de recuento en el microscopio usando el objetivo de menor aumento.
13. **ENFOCAR** las líneas de la rejilla en la cámara. Mueva el portaobjetos hasta que el campo que vea sea la rejilla externa. Utilizar un objetivo de

mayor aumento si resulta más cómodo para observar el campo de células a contar.

14. **CONTAR** todas las células vivas (no incorporan el colorante y se observan brillantes y de color blanquecino) y todas las muertas (incorporan el colorante y se observan de un color azul) que hay dentro de cada una de las cuadrículas pequeñas. **ANOTAR** el número de células viables (claras y brillantes) y no viables (teñidas con un color azul profundo) en el registro de datos del cultivo celular.

Figure 10: Trypan blue staining of cells



15. **GUARDAR** el hemocitómetro a temperatura ambiente hasta que sea necesario para el siguiente recuento de células del experimento.

NOTA: No intente limpiar las células fuera del pocillo usado ya que podría inutilizar las cámaras de recuento no utilizadas.

CÁLCULO DEL NÚMERO DE CÉLULAS VIABLES Y NO VIABLES

La viabilidad celular del cultivo la expresamos como la relación existente entre el número de células viables respecto del número total de células.

La fórmula de cálculo de las células viables / ml y de las no viables / ml es la siguiente:

n° células totales viables (o no viables) presentes en el total de las 9 zonas de conteo del portaobjetos (cámara de Neubauer) = n° células viables (o no viables) contadas x factor de multiplicación x factor de dilución.

Factor de multiplicación = 4500.

Factor de dilución = 2 (en este caso, hemos diluido dos veces las células antes de depositarlas en la cámara de conteo).

Por ejemplo: Se diluyen 10 µl de células en 10µl de colorante azul de tripano y se cuentan 75 células en 9 rejillas pequeñas

- Número total de células viables = 75
- Factor de multiplicación = 4500
- Factor de dilución = 2

Para calcular células viables/ml = $75 \times 4500 \times 2 = 6,75 \times 10^5$ células/ml

Nota: También debe realizarse con las células no viables que hemos contado.

CÁLCULO DE LA VIABILIDAD CELULAR. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES

La viabilidad celular se puede determinar calculando el porcentaje de células viables presentes en el cultivo respecto el número total de células del cultivo (viables + no viables).

La fórmula que se tiene que aplicar, es la siguiente:

Viabilidad = Número de células viables/nº total de células (viables + NO viables) x 100

Por ejemplo: De las células que hemos contado, 75 son brillantes (viables) y hemos contado 15 que eran de color azul profundo (no viables).

Para calcular la viabilidad = $75/90 \times 100$. La **viabilidad** es del 83.3%.

CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR

Para realizar la curva de crecimiento celular, **necesitamos obtener los datos de las células viables y no viables presentes en el cultivo, durante sucesivos días (por ejemplo, días 1, 2, 3, 4, 7 después del inicio del cultivo).**

1. **REALIZAR** un conteo celular y un ensayo de viabilidad como se describe en la sección anterior cada 24 horas hasta que no se detecte un cambio en el número de células/ml del cultivo (fase estacionaria). Utilice un pocillo nuevo en el hemocitómetro para cada medición.

NOTA: Normalmente, teniendo en cuenta nuestras condiciones de cultivo celular, a partir de los 5 días, el cultivo llega a la fase estacionaria, aunque las tasas de crecimiento pueden variar de un experimento a otro debido a cambios en la temperatura y el número de células iniciales.

2. Utilizando una hoja de papel cuadrado logarítmico o bien un programa gráfico de ordenador, **REGISTRAR/DIBUJAR** los datos de concentraciones celulares (células/ml) en una escala logarítmica en función del tiempo (en días) de cultivo.

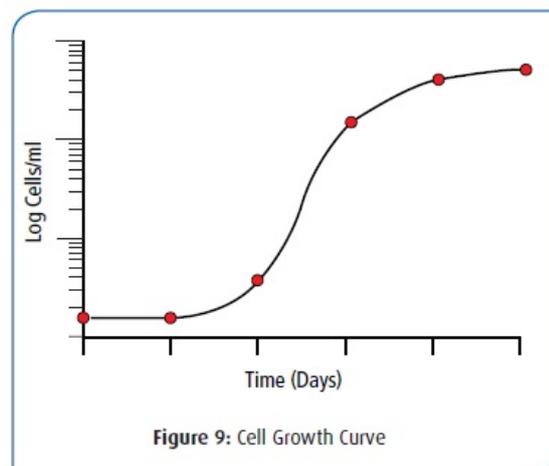


Figure 9: Cell Growth Curve

3. **IDENTIFICAR** y rotular cada una de las fases del crecimiento: latencia, crecimiento exponencial y estacionaria para el cultivo celular.

NOTA: La fase de latencia no siempre se observa en cultivos de rápido crecimiento.

4. Seleccionar un intervalo de tiempo durante la fase de crecimiento y **CALCULAR** el **tiempo de duplicación** para el cultivo, el tiempo requerido

para que el número de células/ml se duplique. El tiempo de duplicación se puede determinar identificando un número de células a lo largo de la fase de crecimiento de la curva, trazando la curva hasta que ese número se ha duplicado y calculando el tiempo entre estos dos puntos.

ANEXO 1: PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

1. ¿Por qué el cultivo de células se ha convertido en una herramienta tan importante para los investigadores?
2. ¿Cuáles son las ventajas y aplicaciones del cultivo de células de insectos?
3. ¿Por qué se recomienda subcultivar las células al alcanzar una confluencia de 80 – 90%?
4. ¿Cuál es la razón para dejar una pequeña cantidad de medio de cultivo viejo en el frasco al alimentar o dividir las células?
5. Describir los síntomas comunes de la contaminación bacteriana.
6. ¿Por qué sería importante determinar el tiempo de duplicación de una línea celular? ¿Qué información indica el tiempo de duplicación de las células?

ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PRÁCTICA Y ANÁLISIS

Los resultados esperados variarán dependiendo de las características de crecimiento de las células. La viabilidad y la tasa de crecimiento de las células dependen, en gran medida, de las condiciones en las que se cultivan las células, incluyendo la densidad celular inicial, la temperatura, la confluencia y la precisión del pipeteado.

Las curvas de crecimiento celular variarán dependiendo de muchos factores, incluyendo la densidad inicial de células, la temperatura de cultivo y la salud de las células. Las células sanas pueden no experimentar una fase de latencia después de transferirlas a un frasco nuevo y entrarán inmediatamente en la fase de crecimiento exponencial.

Los resultados obtenidos con las células teñidas con colorante Giemsa pueden sufrir variaciones entre los grupos de estudiantes, debido a las variaciones en la preparación celular y la intensidad de la tinción.

ANEXO 3: PREPARACIÓN DE LA PRÁCTICA POR PARTE DE LOS PROFESORES

Es muy importante que el profesor de prácticas **tenga en cuenta** las siguientes consideraciones:

a) Al recibir el kit de prácticas

Comprobar que el material recibido es el indicado en la hoja de envío.

Cultivar cada uno de los 3 tubos de células en cada frasco de cultivo de 25 cm² (con tapa azul).

b) Antes del inicio de las prácticas

Desinfectar la zona de trabajo con etanol al 70% (preferiblemente trabajar en una campana de flujo).

Preparar y distribuir el material necesario para el desarrollo de cada práctica antes de su inicio.

Desinfectar el material con etanol al 70% antes de incorporarlo a la zona de trabajo.

Insistir en la necesidad de que todo el material que se utilice esté desinfectado para evitar la contaminación.

Indicar que los rascadores de células estériles deben de lavarse y guardarse para sucesivos usos que no requieren de esterilidad ya que el cultivo no se mantiene y se desecha (Módulo III).

c) Durante las prácticas

Recordar que los alumnos deben de realizar un cambio de medio de cultivo de las células a los 3 días de cultivarlas en las placas.

Organización e implementación previas de la práctica

Las instrucciones que se presentan en este protocolo son las indicadas para realizar las prácticas con seis grupos de alumnos.

Antes de empezar cada práctica, revisar cuidadosamente la lista del Material necesario que figura en la cabecera al inicio de cada módulo. Asegurarse de tener todos los componentes y los equipos necesarios.

IMPORTANTE: Las células deben ser cultivadas inmediatamente después de su recepción. Ver apartado Inicio del cultivo de este anexo.

Precauciones

Los medios contienen antibióticos para mantener los cultivos libres de contaminación. **Los estudiantes que tengan alergias a los antibióticos tales como penicilina, estreptomicina o gentamicina, **NO** deben de participar en este experimento.**

Esterilización de equipos y materiales

1. Esterilizar la poyata del laboratorio con una solución de etanol al 70% o cualquier otro desinfectante comercial para laboratorios.

2. Todos los materiales, tanto sólidos como líquidos, que entran en contacto con las células y se han de desechar, deben ser desinfectados antes de su eliminación, incluyendo placas y frascos de cultivo, medios de cultivo, pipetas, pipetas de transferencia y tubos.

Líquidos:

Tanto si queremos eliminar el medio de cultivo que hemos descartado y hemos depositado en los vasos de precipitados, como si queremos eliminar los cultivos celulares, debemos añadir unos mililitros de lejía al 10% durante un mínimo de 1 hora y luego descartarlo. Las botellas de plástico, frascos y placas, depositarlos en una bolsa de autoclave y tratarlo como material sólido de eliminación.

Sólidos:

Recoger todos los materiales contaminados en una bolsa desechable esterilizable en autoclave. Selle la bolsa y colóquela en una bandeja de metal para evitar cualquier posibilidad de que el líquido remanente se derrame en la cámara del esterilizador.

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Orientación del tiempo aproximado de los procedimientos de la práctica

La práctica se divide en cinco módulos y debe durar aproximadamente dos semanas. Las siguientes Tablas son una guía para la implementación de esta práctica, que pueden ser adaptadas a las circunstancias específicas de cada clase.

Módulo	Preparaciones previas	Experimento
I	15 min.	15-30 min.
II	20-25 min	1. Cambio de medio: 10 min. 2. Amplificación: 50-60 min
III	15 min.	20-30 min.

NOTA: El experimento en el Módulo III **se realizará varias veces** para recopilar los datos utilizados en la representación de una curva de crecimiento. Recomendamos repetirlos en los días indicados para obtener unos resultados que sean indicativos del proceso.

Cuadro/Resumen de las preparaciones previas

Preparación para:	Qué hacer:	¿Cuándo?	Tiempo requerido
Iniciar el cultivo celular	Traspasar las células recibidas a los frascos de cultivo	Inmediatamente después de la recepción de las células (*)	15 min.
Módulo I: Observación y evaluación del cultivo celular	Preparar los microscopios compuestos	En cualquier momento antes de la práctica en el laboratorio	15 min.
Módulo II: Manipulación del cultivo de células de insecto	Preparar y distribuir los materiales	Una hora antes de realizar la práctica	20-25 min.
Módulo III: Viabilidad y Cinética del crecimiento celular	Alicuotar azul de tripano y distribuir los materiales	En cualquier momento antes del primer recuento de viabilidad	20-30 min.

Recomendamos preparar el equipo y los reactivos para los [Módulos I y II](#) antes de comenzar la práctica con los estudiantes. Los reactivos para el [Módulo III](#) se pueden preparar según sea necesario una vez que los grupos de estudiantes hayan avanzado a esos apartados de la práctica (minimizamos el tiempo previsto para la preparación de la práctica). Tener preparado un microscopio para la observación y análisis celular a lo largo de todos los [Módulos](#).

NOTA: La observación del cultivo celular en placas, es muy recomendable que se realice con ayuda de un microscopio invertido. **En caso de no disponer, comprobar que la placa que contiene las células tiene, como máximo, la altura que hay entre la platina y los objetivos del microscopio.**

INICIO DEL CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS

Se detallan las preparaciones a realizar lo antes posible una vez recibido el kit:

a) Preparación de las cámaras de incubación

Es necesario preparar una cámara incubadora para contener las células. Los incubadores deben mantenerse entre 24-27°C una atmósfera estándar. Un gran recipiente de plástico o caja de cartón puede servir como una gran incubadora para toda la clase (puede utilizarse la misma caja DANAGEN en la que se envía el kit). Las células de insectos prefieren crecer en la oscuridad, por lo que los envases transparentes deben estar cubiertos con papel de aluminio.

NOTA: Se recomienda que las cámaras incubadoras se esterilicen limpiándolas con etanol 70% antes de iniciar el experimento.

b) Preparación de alícuotas del medio de cultivo de células (Módulo II).

1. **ALICUOTAR** asépticamente **20 ml** de **Medio de cultivo para células (A)** en cada uno de los seis tubos cónicos de 50 ml, previamente identificados según el grupo de alumnos. Reserve el medio restante para iniciar el cultivo de células de insectos.
2. **ETIQUETAR** cada tubo como **Medio de cultivo de las células de insecto**.
3. **ALMACENAR** a 4 ° C hasta que los estudiantes lo necesiten en el [Módulo II](#).

c) Inicio del cultivo de las células recibidas

Las células de insecto Sf9 (A) se envían en un tubo de 3 ml y, tan pronto como se reciban, se deben transferir a un frasco de cultivo de 25 cm².

1. **ATEMPERAR** el medio de cultivo de células de insecto a temperatura ambiente.
2. **AÑADIR 1ml** de medio de cultivo de células de insecto a cada uno de los 3 Frascos de Cultivo, identificándolos según el grupo de alumnos al que corresponda, manteniéndolos en posición vertical.
3. **INVERTIR** suavemente el tubo de las células para mezclar el contenido.
4. Utilizando una pipeta de transferencia estéril o una punta de micropipeta estéril, **TRANSFERIR** todo el volumen de células de insecto Sf9 (A) a cada frasco (estériles) de cultivo celular.

NOTA:NO vierta directamente las células decantando el tubo sobre el frasco de cultivo, ya que esto aumenta el riesgo de contaminación.

5. **INCUBAR** el frasco de cultivo celular en la cámara de incubación.
6. Después de 24 horas, las células de insecto deberían haberse adherido a la superficie del frasco. **CONFIRMAR** la adherencia de las células bajo un microscopio.
7. **PERMITIR** que las células crezcan durante 24-72 horas adicionales, comprobando la salud y la confluencia de las células diariamente. Se recomienda que, si al cabo de 72h la confluencia no es aun de 80% - 90%, realicen un cambio de medio de cultivo, retirando con una pipeta pasteur el medio de cultivo contenido en el frasco de cultivo, siempre dejando un remanente, y añadiendo 4ml de medio de cultivo de células de insecto nuevo precalentado a 27°C o atemperado en el mismo laboratorio. **Las células deben tener al menos 80% de confluencia antes de iniciar los siguientes experimentos.**

PREPARACIÓN MÓDULO I: OBSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ESTADO DEL CULTIVO CELULAR

PREPARAR los microscopios invertidos para el análisis de células de insectos. Preferentemente se utilizarán microscopios invertidos, aunque en caso de no disponer de ellos, se puede utilizar microscopios de contraste de fase o de campo brillantes para las observaciones. En este caso, las muestras de cultivos celulares utilizadas en este experimento son de aproximadamente 2,5 cm de altura, por favor asegúrese de que haya un espacio suficiente entre la platina y los objetivos para ver las células. En el caso de no caber pueden usar placas de cultivo de 35 mm, haciendo un pase de las células del frasco con 1ml de las células y 2ml de medio de cultivo.

Cada grupo necesita:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles de 10 ml	

PREPARACIÓN MÓDULO II: MANIPULACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

1. **SACAR** de la nevera las alícuotas del medio de cultivo de las células de insecto y dejarlas calentar a temperatura ambiente.
2. **REPARTIR** los componentes necesarios para cada grupo.

Para el Módulo II-A

Cada grupo necesita:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	<input type="checkbox"/> Medio de cultivo de células de insecto
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles pasteur	

Para el Módulo II-B

Cada grupo necesita:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	<input type="checkbox"/> Medio de cultivo de células de insecto
<input type="checkbox"/> Dosificador/pera de pipetas	<input type="checkbox"/> Placa de cultivo celular de 35mm
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles de 10 ml	<input type="checkbox"/> Rascadores de placas
<input type="checkbox"/> Pipetas de volumen variable	<input type="checkbox"/> Puntas de pipeta (estériles)
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles pasteur	<input type="checkbox"/> Cámara de conteo de células (Neubauer)
<input type="checkbox"/> Tubo estéril de 15 ml	

PREPARACIÓN MÓDULO III: VIABILIDAD Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO CELULAR

1. **ALICUOTAR** en tubos de microcentrífuga 250 µl de **azul de tripano (D)** para los 6 grupos.

NOTA: Cada grupo recibirá una alícuota de azul de tripano y una cámara de recuento. Estos deben guardarse después del experimento para su uso en ensayos de recuento posteriores.

Cada grupo necesita:

<input type="checkbox"/> Guantes	<input type="checkbox"/> Máscara facial
<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Etanol al 70%
<input type="checkbox"/> Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	<input type="checkbox"/> Tampón fosfato (PBS 1x)
<input type="checkbox"/> Azul de tripano	<input type="checkbox"/> Rascadores de placas
<input type="checkbox"/> Pipetas de volumen variable	<input type="checkbox"/> Puntas de pipeta (estériles)
<input type="checkbox"/> Pipetas estériles pasteur	<input type="checkbox"/> Tubos de microcentrifuga

* **NOTA:** Agregue unos mililitros de lejía al 10% a cada vaso de precipitado para desinfectar los desechos de cultivo celular.

	(#vivas x volumen)										
	% viabilidad (#vivas/#muertas)										
	Fase del ciclo de crecimiento										

OBSERVACIONES:

