

BIOLOGIA Y CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es familiarizar a los estudiantes con un sistema de cultivo celular sencillo y fiable. Los estudiantes serán introducidos en los principios básicos del cultivo celular y utilizarán la técnica estéril para examinar el crecimiento celular y la viabilidad de las células de insecto Sf9.

2. MATERIAL Y REACTIVOS

Componentes	CONSERVACIÓN
A. Células de insecto (Sf9).	Tª ambiente
B. Medio de cultivo de las células de insecto.	Nevera (4°C)
C. Medio para la práctica de técnica estéril.	Nevera (4°C)
D. Colorante azul tripán.	Tª ambiente
E. Tampón Fosfato Salino (PBS 1x).	Tª ambiente
F. Colorante Giemsa.	Tª ambiente
Frasco cultivo celular (estéril, 25 cm²) (T-25).	Tª ambiente
Placas de cultivo celular (estéril, 60 mm).	
Cámaras de recuento celular.	
Pipetas grandes de transferencia (estériles).	
Pipetas pequeñas de transferencia.	
Pipetas de 10 y 25 ml (estériles).	
Tubos de fondo cónico de 15 ml.	
Tubos de fondo cónico de 50 ml.	
Tubo de centrifuga de 1,5 ml	

Esta práctica está diseñada y tiene los reactivos y materiales suficientes para 6 grupos de estudiantes.

NOTA: Las células de insecto Sf9 se deben solicitar 2 semanas antes de comenzar el experimento. Las células de insecto se han de **cultivar inmediatamente** después de su recepción.

NOTA: El **Medio de cultivo de las células de insecto** y el **Medio para la práctica de técnica estéril** 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

- Recipiente grande con cubierta de plástico o caja de cartón con tapa, para su uso como cámara de incubación (la caja EDVOTEK pueden utilizarse para hacer crecer los cultivos).
- Etanol 70% en botellas de aerosol.
- Metanol.
- Pipeta con pera de succión o pipeta automática.
- Microscopio de contraste de fase invertida / campo brillante (las células se pueden ver con un microscopio de estudiante en posición vertical).
- 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 (vaso de precipitado).

NOTA: El frasco para el cultivo celular utilizado en esta práctica tiene aproximadamente 2,5 cm de altura. Deben asegurarse que hay suficiente espacio entre el portaobjetos y los objetivos para ver las células.

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 el ambiente natural de las células en un laboratorio 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 muchas células cultivadas para mutaciones que les permiten crecer en cultivo indefinidamente, 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 la transición fuera de animales vivos. Además de reducir las pruebas en animales, el cultivo celular ha aumentado la reproducibilidad y 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 pueden examinar las células sanas y enfermas, monitorear los efectos de las adiciones o supresión de genes o detectar terapias eficaces.

El cultivo de células de insectos Sf9

El cultivo de células de insectos se originó como un enfoque para comprender mejor 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 de la gusano común de la caída, *Spodoptera frugiperda* (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.



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

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 de la cultura también hace de las células de insectos un sistema modelo útil para el aula.

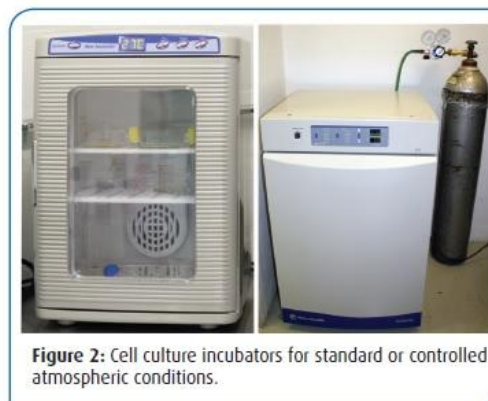
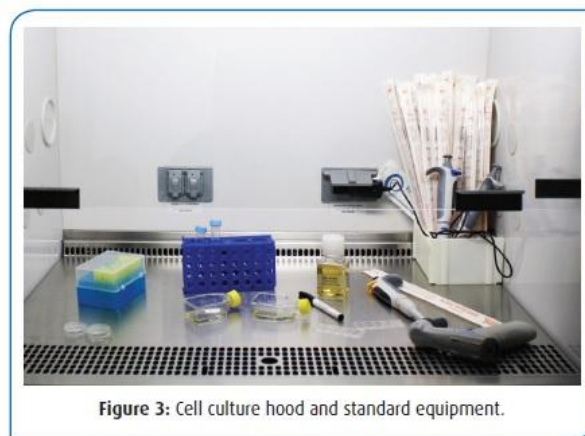


Figure 2: Cell culture incubators for standard or controlled atmospheric conditions.

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 adherentes se adhieran y crezcan. La mayoría de las líneas celulares no humanas son no patógenas y pueden cultivarse en campanas de cultivo simples. 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 niveles elevados de equipo 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.



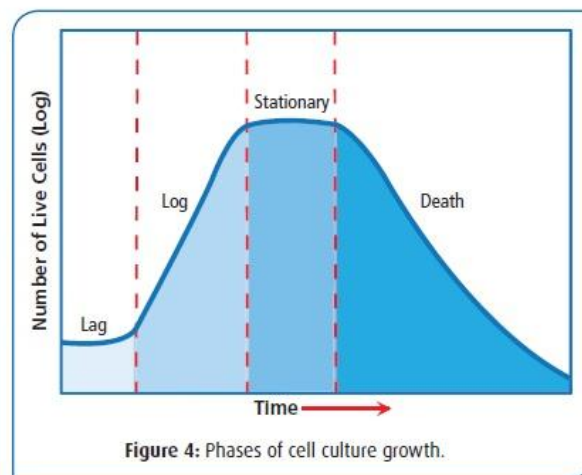
Las células se cultivan en medio de crecimiento, una solución químicamente compleja que proporciona los nutrientes necesarios para que las células crezcan. Los medios contienen típicamente aminoácidos esenciales, tampones, sales y una fuente de carbono como la glucosa. Esta mezcla se equilibra cuidadosamente para su uso con líneas celulares específicas y la elección de los medios es esencial para el crecimiento y el comportamiento adecuados. Además, 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. Manchas especiales están disponibles para acentuar las estructuras celulares y mejorar las observaciones. Por ejemplo, el azul trypan, 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 trypan 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 trypan sólo las células muertas se tiñen 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 en una mezcla.

Crecimiento y mantenimiento de las células cultivadas

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 hayan agotado el medio de crecimiento de componentes esenciales o hayan ocupado todo el espacio disponible. En este último caso, las células se transforman en células inhibidas por contacto y dejarán de dividirse. Por lo tanto, es necesario pasar las células a otro frasco, para ello se debe retirar una pequeña porción de las células y el medio existente y transferirlo a un nuevo contenedor con medio nuevo. El paso de las células proporciona más espacio y un medio nuevo para que proliferen las células y promover su crecimiento.

Después de pasar las células pasan por tres fases distintas de crecimiento (Figura 4).



- **Fase de latencia:** Inmediatamente después de ser pasado en un frasco nuevo las células pueden entrar en una fase de latencia del crecimiento donde hay poco aumento en el número de células. Durante este tiempo, las células "condicionan" los medios secretando proteínas que mejoran el crecimiento. La densidad celular es baja, con células que cubren menos de 50% de la superficie (conocido como 50% **confluentes o de confluencia**, ver figura 8). La fase de latencia puede durar alrededor de 1-2 días.
- **Fase de crecimiento (o exponencial):** El número de células aumenta exponencialmente durante esta fase, y el crecimiento celular continuará siempre y cuando haya suficientes nutrientes para mantener el número de células en crecimiento. Las células son un 50-80% confluentes, 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 subcultivo fresco. En este punto, las células son 90-100% confluentes.

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 de cultivo celular son esenciales tanto para la investigación académica como industrial. Los científicos usan rutinariamente líneas celulares para tratar preguntas sobre el comportamiento de células, tejidos e incluso organismos enteros. Por ejemplo, el cultivo celular ha mejorado nuestra comprensión de la evolución, la función celular y el comportamiento, y el desarrollo temprano en los animales. Estos experimentos también son valiosos para examinar el ADN, el ARN y la función de las proteínas a nivel celular. El cultivo celular también se utiliza comúnmente para desarrollar y detectar fármacos potenciales, permitiendo el descubrimiento 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 existentes. 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 minimizar el uso de animales de investigación y prevenir el sufrimiento de los animales. La investigación futura continuará mejorando nuestra comprensión de las funciones celulares y mejorando la salud humana.

En esta práctica, los estudiantes desarrollarán habilidades prácticas 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. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA

El objetivo de este experimento es familiarizar a los estudiantes con un sistema de cultivo celular sencillo y fiable. Los estudiantes serán introducidos en los principios básicos del cultivo celular y utilizarán la técnica estéril para examinar el crecimiento celular y la viabilidad de las células de insecto Sf9.

4.1 Organización e implementación previas de la práctica

Las instrucciones que se presentan en este protocolo están preparadas para seis grupos de laboratorio.

Antes de comenzar esta práctica, revisar cuidadosamente la lista de Componentes y Material necesario en el apartado [2. MATERIAL Y REACTIVOS](#), para asegurarse de tener todos los componentes y equipos necesarios.

IMPORTANTE: ¡Las células deben ser cultivadas inmediatamente después de su recepción!

4.2 Precauciones

¡NOTA IMPORTANTE!!: Este experimento contiene antibióticos para mantener los cultivos libres de contaminación. **Los estudiantes que tengan alergias a los antibióticos, como PENICILLIN o STREPTOMYCIN, NO deben participar en este experimento.**

1. Los guantes y las gafas de seguridad deben usarse rutinariamente como buenas prácticas de laboratorio.
2. Tener mucho cuidado cuando se trabaje con equipos que utilicen juntos el calentamiento y/o la fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - UTILICE PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse siempre las manos con agua y jabón después de trabajar en el laboratorio.
5. Si no está seguro de algo, **¡PREGUNTAR AL PROFESOR DE PRÁCTICAS!**

4.3 Esterilización de equipos y materiales

1. Esterilizar la poyata del laboratorio con una solución de lejía 10%, etanol 70% o cualquier otro desinfectante comercial para laboratorios.

2. Todos los materiales que entran en contacto con las células deben ser desinfectados antes de su eliminación, incluyendo placas y frascos de cultivo, pipetas, pipetas de transferencia y tubos.

- Autoclavar a 121 ° C durante 20 minutos.

Eliminar los medios de cultivo de los frascos y las placas, luego recoja 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 medio líquido se derrame en la cámara del esterilizador.

- Sumergir en solución de lejía 10%.

Sumergir los frascos, tubos y otros materiales contaminados en una solución de lejía 10%. Remojar los materiales durante al menos 1 hora y luego desecharlos. Usar guantes y gafas cuando trabaje con lejía.

4.4 Libreta de laboratorio

Los científicos deben documentar todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento, y, por supuesto, cualquier información recopilada. Los estudiantes que participen en este experimento deben documentarlo en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Antes de iniciar el experimento:

- Leer atentamente la introducción y el protocolo. Utilice esta información para formar una hipótesis para este experimento.
- Predecir los resultados de su experimento.

Durante el experimento:

- Registre sus observaciones.

Después del experimento:

- Interpretar los resultados - ¿Los datos obtenidos apoyan o contradicen la hipótesis inicial?
- En caso de repetir este experimento, ¿qué cambiaría?. Revisar la hipótesis para reflejar este cambio.

4.5 Requisitos de 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.

Requerimientos de tiempo (aproximados)		
Módulo	Preparaciones previas	Experimento
I	30 min.	1 hora
II	15 min.	15-20 min.
III	30 min.	45-60 min.
IV	15 min.	30 min.
V	30 min.	1 hora

NOTA: El experimento en el Módulo IV se realizará varias veces para recopilar los datos utilizados en la representación de una curva de crecimiento. Recomendamos un mínimo de 3 días diferentes para obtener mejores resultados.

4.4 Preparaciones y consideraciones previas. **INSTRUCTOR**

Preparaciones previas

Preparación para:	Qué hacer:	¿Cuándo?	Tiempo requerido
Iniciar el cultivo celular	Inocular el frasco con células de insecto	Inmediatamente después de la recepción de las células - aprox. Una semana antes de iniciar el experimento	15 min.
Módulo I: Técnica aséptica básica	Preparar y distribuir alícuotas	Una hora antes de realizar el experimento	30 min.
Módulo II: Examen de los Cultivos de las Células de Insecto	Preparar microscopios compuestos	En cualquier momento antes de la práctica en el laboratorio	15 min.
Módulo III: Mantenimiento del cultivo de células de insectos	Preparar materiales	Una hora antes de realizar la práctica	30 min.
Módulo IV: Ensayos de Viabilidad de las Células usando colorante Azul Tripán	Alicuotar el colorante Azul Tripán y distribuir materiales	En cualquier momento antes del primer recuento de viabilidad	15 min.
Módulo V: Ensayo de tinción diferencial utilizando colorante de Giemsa	Alicuotar el colorante Giemsa	Una hora antes de realizar el experimento	15 min.
	Metanol pre-enfriado	En cualquier momento antes de realizar la práctica	15 min.

NOTA: Para obtener los mejores resultados, repasar la técnica aséptica básica ([Módulo I: Técnica aséptica básica](#)) antes de comenzar cualquier experimento de laboratorio o preparación de reactivos.

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

NOTA: Las muestras de cultivo celular utilizadas en esta práctica tienen aproximadamente 2,5 cm de altura. Deben asegurarse que hay suficiente espacio entre el portaobjetos y los objetivos para ver las células.

A. INICIAR EL CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS.

Preparación de las Cámaras de Incubación

Es necesario preparar una cámara incubadora para contener las células. Las incubadoras deben mantenerse entre 24-27°C y la atmósfera estándar. Un gran recipiente de plástico o caja de cartón puede servir como una gran incubadora para toda la clase. 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.

Alicuotar el medio de cultivo de células de insectos

1. **ALICUOTAR** asépticamente **15 ml** de **Medio de cultivo para células (B)** en seis tubos cónicos de 50 ml. 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 III](#).

Iniciar el cultivo de las células de insectos

Las células de insecto Sf9 (A) se envían en un tubo de 5 ml y se deben transferir a un frasco tan pronto como se reciban.

1. **CALIENTAR** a temperatura ambiente el medio de cultivo para las células de insecto.
2. Invertir suavemente el tubo de las células para mezclar el contenido.
3. Utilizando una pipeta de transferencia estéril o una punta de micropipeta estéril, **TRANSFERIR** todo el volumen de células de insecto Sf9 (A) a un frasco de cultivo celular estéril.

NOTA: NO vierta las células en el frasco, ya que esto aumenta el riesgo de contaminación.

4. Utilizando una pipeta de transferencia nueva, añadir 2 ml de medio de cultivo de células de insecto fresco al frasco.
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 unión 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. **Las células deben tener al menos 80% de confluencia antes de pasar en los siguientes pasos.**
8. Utilizando la pipeta desechable de 25 ml y una pera de pipeta, **AÑADIR** 4 ml de medio de cultivo de células de insectos a seis frascos T25, una para cada grupo de estudiantes.
9. **GOLPEAR suavemente** el lado del frasco y pipetear con cuidado arriba y abajo con una pipeta estéril de 10 ml para aflojar las células. Añadir 1 ml de células a cada frasco preparado.
10. **COLOCAR** cuidadosamente los frascos de los estudiantes en las incubadoras hasta que lo necesiten. El frasco inicial y cualquier resto de células se pueden mantener o descartar.

B. MÓDULO I: APRENDIZAJE DE LA TÉCNICA ASÉPTICA BÁSICA

1. **ALICUOTAR** asépticamente 5 ml de **Medio para la práctica de la Técnica Estéril (C)** en seis tubos de 15 ml utilizando una pipeta estéril de 10 ml. Cada grupo debe tener su propio tubo de medio para reducir la posibilidad de contaminación.

Para el Módulo I

Cada grupo necesita:

Pipeta desechable estéril, **Medio para la práctica de la Técnica Estéril (C)**, placa de cultivo celular de 35 mm, guantes, bata de laboratorio, mascarilla, etanol 70%.

C. MÓDULO II: EXAMEN DE LOS CULTIVOS DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS

Preparar microscopios para el análisis de células de insectos. Se utilizarán microscopios de contraste de fase o de campo brillantes para las observaciones. 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.

D. MÓDULO III: MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS

1. **SACAR** de la nevera (conservación a 4°C) 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 III-A

Cada grupo necesita:

Tubo de medio de cultivo de las células de insecto, dos pipetas desechables estériles, vaso de precipitado (desechos), guantes, bata de laboratorio, máscara facial, etanol 70%.

Para el Módulo III-B

Cada grupo necesita:

Tubo de medio de cultivo de las células de insecto, pipeta de 10 ml, pera de succión de pipeta, dos placas de cultivo celular de 35 mm, dos pipetas estériles desechables, vaso de precipitados de desecho, guantes, bata de laboratorio, máscara facial, etanol 70%.

E. MÓDULO IV: ENSAYOS DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS UTILIZANDO COLORANTE AZUL TRIPÁN

1. **ALICUOTAR** en tubos individuales de 250 µl de **Azul Tripán (D)** para los 6 grupos.

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

Para el Módulo IV

Cada grupo necesita:

Tubos de microcentrífuga, pipetas de transferencia, micropipeta y puntas, guantes, **azul tripán**, cámara de recuento, vaso de precipitados (desechos)*.

* **NOTA:** Agregue una pequeña cantidad de lejía a cada vaso de precipitado para desinfectar los desechos de cultivo celular.

F. MÓDULO V: ENSAYO DE TINCIÓN DIFERENCIAL CON COLORANTE GIEMSA

Se suministran materiales y reactivos suficientes para teñir 6 placas de células.

1. **ALICUOTAR** 10 ml de **PBS** (F) en tubos de 15 ml y 1 ml de **Colorante Giemsa** (G) en tubos de 1,5 ml para cada grupo (6 en total).
2. **PREPARAR** metanol enfriado (helado) poniendo recipientes pequeños de metanol 100% en un congelador a -20°C al menos 1 hora antes del período de laboratorio.

Para el Módulo V

Cada grupo necesita:

Pipetas de transferencia, **PBS**, **Colorante Giemsa**, metanol helado, vaso de precipitados, guantes.

5. PRÁCTICA

5.1 Módulo I: Técnica aséptica básica

Es importante preparar un área limpia designada antes de comenzar los experimentos de cultivo celular. Comenzar con una superficie completamente limpia y no porosa que ha sido limpiada y desinfectada. Seguir los procedimientos descritos a continuación para mantener las condiciones asépticas a lo largo de todo el experimento.

PARA EL MÓDULO I

Material necesario:

Guantes, bata de laboratorio, máscara facial, etanol 70%, pipetas estériles de 10 ml, medio para la práctica de técnica estéril, placa de cultivo celular de 35 mm.

A. PREPARACIÓN DE LAS CÁMARAS DE INCUBACIÓN ESTÉRIL

Las incubadoras de cultivos celulares especializadas son ampliamente utilizadas en microbiología y biología celular para cultivar bacterias y células eucarióticas. Las incubadoras mantienen el control de temperatura, humedad y otras condiciones tales como el dióxido de carbono y el contenido de oxígeno de 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.

Si hay una incubadora en el laboratorio se puede ajustar para mantener una temperatura de 27°C . Antes de comenzar el experimento, todas las superficies internas deben limpiarse con etanol 70% para desinfectarlas. Si no dispone de una incubadora, se puede utilizar una caja de cartón de tamaño apropiado o un recipiente de plástico con tapa (Figura 5) como incubadora casera. Se puede usar un único contenedor, de tamaño adecuado, como incubadora para almacenar todos los frascos de todos los grupos de la clase (se deben rotular todos los frascos para reconocer al grupo a que pertenecen).



Figure 5: The EDVOTEK shipping box makes an excellent incubation chamber.

1. Las células de insectos prefieren crecer en un ambiente oscuro y no crecerán bajo luz directa. Si es necesario, **CUBRIR** la cámara de incubación (o contenedor) con papel de aluminio para evitar la luz.
2. **LIMPIAR** el interior de la cámara (o contenedor) con etanol 70% y dejar que las superficies se sequen completamente.
3. **COLOCAR** la cámara en un área libre de corrientes de aire que mantenga una temperatura entre 24-27°C. Es mejor evitar ventanas o respiraderos que puedan alterar la temperatura de la cámara.

B. APRENDIZAJE DE LAS TÉCNICAS ASÉPTICAS BÁSICAS

El cultivo exitoso de células depende de mantener las células libres de contaminación de microorganismos tales como bacterias, hongos y virus. Todos los materiales que entran en contacto con el cultivo celular deben ser estériles y las manipulaciones no deben permitir que el entorno no estéril pueda contaminar el cultivo. Leer cuidadosamente las siguientes instrucciones antes de comenzar cualquier experimento de cultivo celular.

Higiene personal

1. La utilización de **batas de laboratorio y mascarillas son MUY RECOMENDADAS** para minimizar el riesgo de contaminación de los cultivos celulares. Se debe mantener el pelo largo atado y hablar lo mínimo posible durante la manipulación de los cultivos celulares.
2. Se deben usar **guantes desechables** en todo momento. **ROCIAR** los guantes desechables con etanol 70% y frotar ambos guantes para desinfectarlos. Esto se debe hacer con frecuencia mientras se trabaja con las células para evitar la contaminación. Cambiar los guantes según sea necesario e inmediatamente desinfecte el nuevo par con etanol 70%.

Preparar el área de trabajo y materiales

1. **ESTERILIZAR** todas las superficies de la poyata de trabajo con etanol 70% y una toalla de papel limpia.
2. **REUNIR** todo el material necesario y limpiar cualquier botella o tubo con etanol 70%.

NOTA: Llevar sólo los elementos necesarios para un procedimiento particular al área de cultivo celular.

3. **ORGANIZAR** el área de trabajo (a) para tener fácil acceso sin tener que alcanzar más de un objeto para llegar a otro y (b) dejar un espacio amplio y claro en el centro de la poyata. Si tiene demasiadas cosas cerca de usted, inevitablemente puede tocar o rozar la punta de una pipeta estéril contra una superficie no estéril.
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.

Pipetear

1. **TRANSFERIR** grandes volúmenes de líquidos utilizando pipetas de plástico estériles desechables (10 ml ó 25 ml) junto con bombas (pera) de succión portátiles de pipeta, ya sea motorizadas o a mano. Sujetar la pera de pipeta cómodamente para permitir la operación con una sola mano.
2. **TRABAJAR** sólo dentro de su 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 de transferencia estériles. Estas deben ser retiradas de su cubierta protectora de plástico inmediatamente antes de su uso.

4. **LIMPIAR** inmediatamente cualquier derrame y a continuación volver limpiar el área de trabajo con etanol 70% para reducir la contaminación.

Manejo de botellas y frascos

1. Las botellas no deben estar verticales cuando están abiertas, deben mantenerse en un ángulo lo más inclinado posible pero sin riesgo de derrame (Figura 6, arriba). No dejar los frascos de reactivos/medios abiertos y no trabajar justo por encima de una botella o frasco abierto.



2. Los frascos de cultivo deben colocarse horizontalmente cuando están abiertos y mantenerse en ángulo durante las manipulaciones (Figura 6, parte inferior).

3. **NO VERTER** de 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 (premedido) en la transferencia. El verter provoca la formación de un puente de líquido entre el interior y el exterior de la botella, lo que podría causar contaminación.

C. PRÁCTICA DE LA TÉCNICA ESTÉRIL

1. **SACAR** el **Medio para la práctica de técnica estéril** de la nevera y dejar **ATEMPERAR** en la poyata durante 10 minutos.

2. **ROCIAR** el tubo de medio, pera de succión, y guantes con etanol 70% para desinfectarlos y preparar el área de trabajo con la técnica estéril.

3. Con cuidado, pero rápidamente, **TRANSFERIR** 3 ml de medio de la práctica de técnica estéril a una placa de cultivo celular de 35 mm.

NOTA: Se debe minimizar el tiempo que el medio y la placa están expuestos al ambiente para disminuir el riesgo de contaminación.

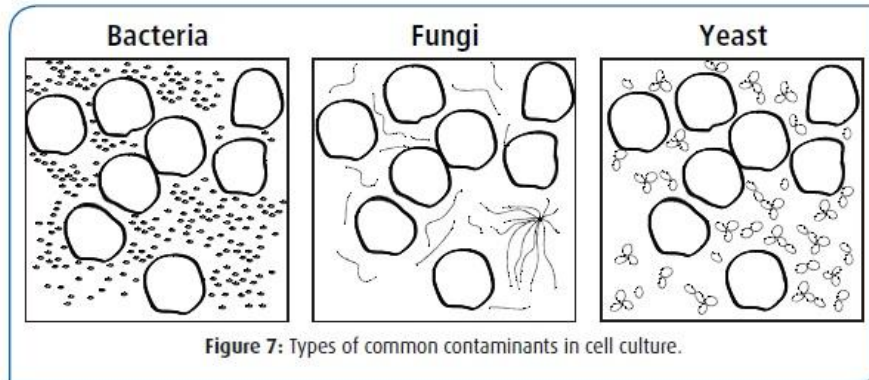
4. **CUBRIR** la placa y colocarla cuidadosamente en la cámara incubadora de cultivo celular preparada. **INCUBAR** la placa durante la noche.

5. **RETIRAR TODAS** las pipetas usadas y no usadas, frascos, y otros materiales del área de trabajo y limpiar la superficie de trabajo con etanol 70%.

6. **VOLVER A GUARDAR** todos los medios y soluciones de stock en el refrigerador.

7. Al día siguiente, **RECUPERAR** la placa de la incubadora y examinarla con un microscopio para comprobar que no hay contaminación. Los medios deben ser claros y de color amarillo claro.

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



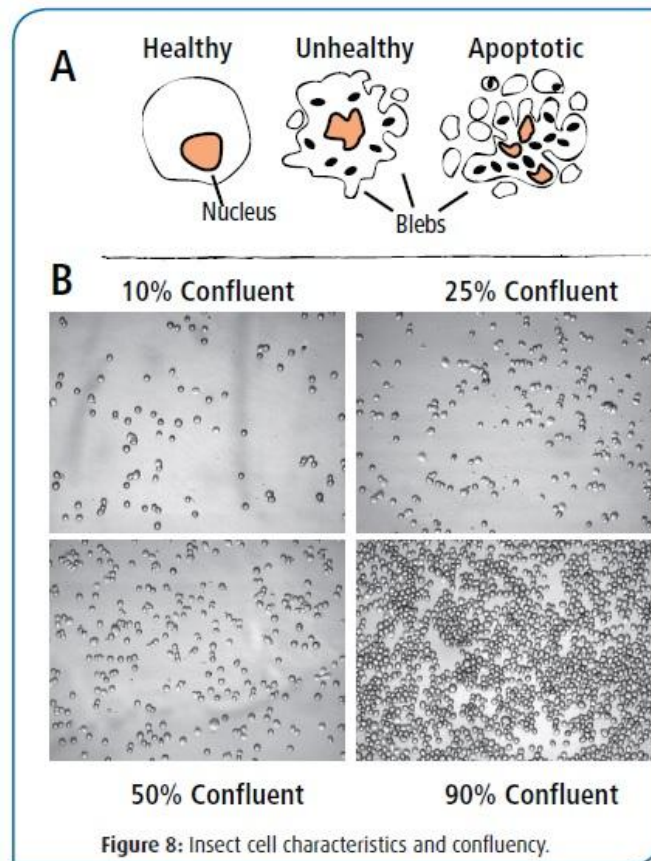
- **Bacterias:** los medios parecen nublados y pueden tener una película blanca en la superficie. Bajo el microscopio se verán células pequeñas y granulares, como puntos negros.
- **Hongos:** micelios filamentosos delgados que cubren el cultivo, como crecimiento borroso (típicamente blanco o negro) que es visible a simple vista.
- **Levadura:** partículas redondas que son más pequeñas que las células de insectos. Normalmente se ve en cadenas de dos o más.

NOTA: Si se observa contaminación, es importante eliminar rápidamente y seguridad los reactivos y placas contaminados para prevenir la propagación de la infección. Revisar si se ha aplicado la técnica estéril adecuadamente y analizar las posibles fuentes de contaminación. Recordar desinfectar el área de trabajo del cultivo celular y todos los materiales que serán utilizados, incluyendo los guantes. Minimizar el tiempo 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.

5.2 Módulo II: Examen de los Cultivos de las Células de Insecto

A. SEGUIMIENTO DE LA SALUD DE LOS CULTIVOS

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



1. **RECUPERAR** un frasco de células de la incubadora de cultivo celular y llevarla a la zona de trabajo del laboratorio. Recordar poner en práctica la técnica aséptica básica al trabajar con las células.

2. Sujetar el frasco contra una fuente de luz y comprobar si el medio está limpio. 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 podrían indicar que los medios celulares necesitan ser cambiados y las células necesitan ser subcultivadas.

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

4. **ANOTAR** las observaciones iniciales sobre el cultivo celular en el registro de datos: aspecto de las células, claridad del medio y presencia o 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.

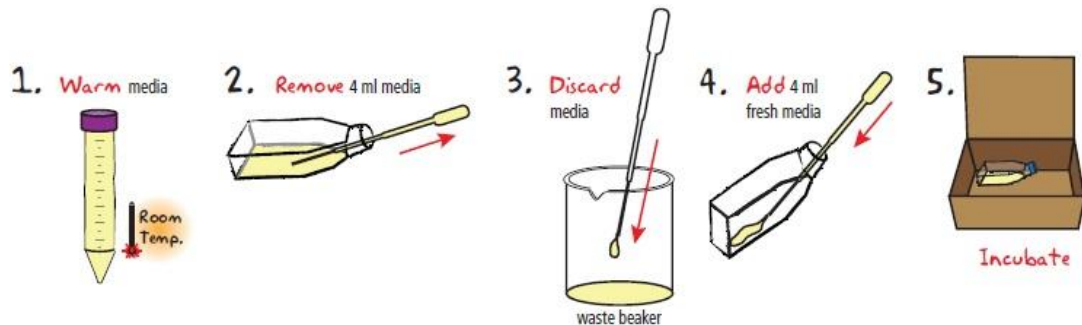
NOTA: Si es posible, tomar fotografías con una cámara digital conectada al microscopio. Incluya las imágenes digitales o las fotografías impresas con los registros del cultivo de células.

5. **DETERMINAR** si las células están listas para ser alimentadas o subcultivadas, o si requieren tiempo adicional para crecer. Las células deben alimentarse cada 5 días y subcultivarse cada 10 días o cuando alcancen una confluencia de 80-90%, lo que ocurra primero (Figura 8B). Para alimentar o subcultivar células, continuar las instrucciones del [Módulo III: Mantenimiento de cultivos de células de insectos](#).

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

5.3 Módulo III: Mantenimiento del cultivo de las células de insectos

A. ALIMENTACIÓN DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS



Las células de insectos cultivadas requieren una fuente consistente de nutrientes para crecer y dividirse, los cuales se proporcionan en el medio de células de insectos. Con el tiempo, las células agotan los nutrientes y factores de crecimiento del medio. Además, los medios de cultivo acumulan productos de desecho tóxicos de las células. Las células dejadas en estas condiciones finalmente morirán, por lo que es importante cambiar regularmente los medios para mantener un cultivo sano. No olvidarse de seguir las técnicas asépticas (revisar el apartado de técnica aseptica básica).

1. **RECUPERAR** el tubo de **Medio para las células de insecto** de la nevera (Se debe guardar a 4°C al recibirse) y dejar que se atempere el medio a temperatura ambiente antes de usarlo.

2. **RETIRAR** 4 ml del medio del frasco con las células en cultivo utilizando una pipeta de transferencia estéril, tener cuidado de no agitar las células en la parte inferior del frasco.

NOTA: Para obtener un crecimiento óptimo, deje 1 ml del medio viejo en el frasco. Este medio contiene factores de crecimiento secretados por las células que son importantes para mantener la salud de las células.

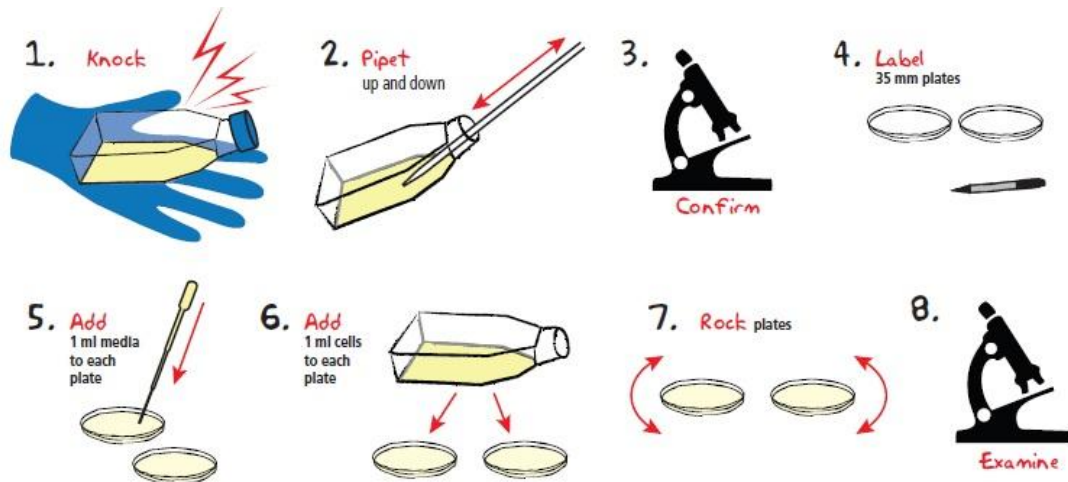
3. **DESECHAR** el medio retirado del frasco en un recipiente de desecho (vaso de precipitado) asignado para este propósito que contenga unos pocos ml de lejía 10%.

4. **AÑADIR** 4 ml de medio para células de insecto fresco usando una pipeta de transferencia estéril nueva.

5. **VOLVER** a depositar el frasco con las células de insecto en la cámara de incubación durante 2-4 días antes de continuar con el [Módulo III-B](#).

NOTA: Recordar que se deben revisar las células de los insectos con frecuencia para controlar el estado de salud del cultivo.

B. SUBCULTIVOS DE LAS CÉLULAS DE INSECTOS



Cuando se alimentan adecuadamente con el medio de células de insecto, las células crecen y se multiplican en la superficie del frasco hasta alcanzar una confluencia del 100%. En este punto, las células dejarán de dividirse porque no hay más espacio para propagarse, lo que se conoce como **inhibición de contacto**. Si se deja en esta condición durante demasiado tiempo, las células perderán la salud y morirán. En cambio, una vez que las células han alcanzado la fase logarítmica tardía del crecimiento y tienen un confluente de 70-80%, es el momento de subcultivar las células en frascos nuevos.

6. **GOLPEAR** suavemente la parte inferior del frasco contra la palma de su mano para sacudir las células sueltas.

7. Usando una pipeta estéril de 10 ml y una pera de succión para la pipeta, **PIPETEAR** la suspensión celular hacia arriba y hacia abajo varias veces para separar las células restantes. Pipetear hacia arriba y hacia abajo también para dispersar las células en una única suspensión de células (eliminando los agregados celulares), para facilitar un crecimiento uniforme en las placas siguientes.

NOTA: Usar suficiente fuerza para separar las células del frasco pero evitando burbujas o espuma en el medio.

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

9. **COGER** dos placas de cultivo celular de 35 mm nuevas y etiquetar ambas con las iniciales de los estudiantes (o la identificación del grupo). Etiquetar una placa "[Módulo IV](#)" y la otra placa "[Módulo V](#)".

10. Utilizar una pipeta de transferencia estéril para **AÑADIR** 1 ml de **Medio para las células de insecto** en cada placa.

11. Utilizando la misma pipeta, **TRANSFERIR** 1 ml de la suspensión de células de insecto en cada placa de 35 mm.

12. Suavemente mover las placas hacia adelante y hacia atrás para **DISTRIBUIR** las células uniformemente. Esto representa una dilución 1:5 de las células en cada uno de los frascos nuevos.

13. **EXAMINAR** las células bajo el microscopio. **CONFIRMAR** que tiene células en sus placas y que sus células son redondas y claras, no marchitas y oscuras.

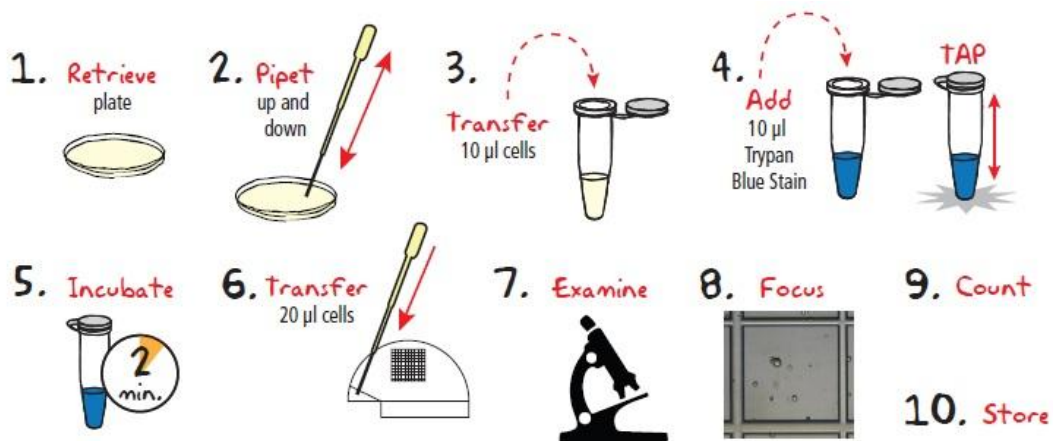
NOTA: En este punto, el frasco puede ser devuelto a la cámara de incubación y controlado para el crecimiento continuo. Alternativamente, las células pueden terminarse añadiendo 1 ml de lejía e incubando el cultivo durante 1 hora antes de desechar.

14. **ANOTAR** los datos necesarios en el registro de datos de cultivo celular.

15. Después de 24 horas, las células de insecto deberían haberse unido a la superficie del frasco y las placas. **CONFIRMAR** la fijación de las células bajo el microscopio.

Una vez que las células han sido subcultivadas en las placas nuevas, se puede proceder a continuar con el [Módulo IV: Ensayos de Viabilidad de las Células utilizando colorante Azul Tripán](#) y el [Módulo V: Ensayo de Tinción Diferencial con colorante de Giemsa](#).

5.4 Módulo IV: Ensayos de Viabilidad de las Células utilizando colorante Azul Tripán



La cámara de recuento de células, o "hemocitómetro", es un dispositivo ampliamente utilizado para contar las células en un volumen específico de fluido. En este caso concreto, la cámara también se utilizará para diferenciar las células muertas de las vivas. Las células vivas y viables excluyen el colorante azul tripán mientras que las células muertas captan el colorante y se tiñen de color azul. Las células se contarán diariamente durante varios días seguidos (hasta una semana) para determinar la tasa de crecimiento y la viabilidad del cultivo.

A. CONTAR LAS CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS

1. **RECUPERAR** su placa de cultivo celular "[Module IV](#)" de la cámara de incubación. Anotar la confluencia en el registro de datos del cultivo celular.

2. **PIPETEAR** las células arriba y abajo tres veces con una pipeta de transferencia estéril para dispersar el cultivo.

3. Utilizando una pipeta de volumen ajustable, **TRANSFERIR** 10 µl de suspensión celular en un tubo de microcentrifuga. **VOLVER** a depositar la placa de las células en la incubadora.

NOTA: Es importante mantener la placa de las células estéril. No olvidarse de seguir las técnicas asépticas (revisar el apartado de técnica aséptica básica).

4. **AÑADIR** 10 µl de colorante azul tripán a las células del tubo de microcentrifuga y suavemente mezclar golpeando suavemente el tubo o pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Esta es una dilución de 2 veces de las células.

5. **INCUBAR** las células del tubo durante 2 minutos a temperatura ambiente.
6. **TRANSFERIR** lentamente 20 μl (aproximadamente una gota) de suspensión de células teñidas de azul tripán a una muesca en el lado inferior izquierdo de un área de recuento de la cámara de recuento de células. La cámara se llenará por acción capilar.
7. **EXAMINAR** la cámara de recuento en el microscopio usando el objetivo más bajo.
8. **ENFOCAR** las líneas de la rejilla en la cámara. Mueva el portaobjetos hasta que el campo que vea sea la rejilla externa - esto también podría requerir el cambio a un objetivo de mayor potencia.
NOTA: El área de la rejilla es de 3 mm x 3 mm, mientras que cada cuadrícula pequeña (área no dividida por ninguna línea adicional) es 0,33 mm x 0,33 mm.
9. **CONTAR** todas las células (vivas y muertas) dentro de cada una de las cuadrículas pequeñas. **ANOTAR** el número de células viables (claras y brillantes) y no viables (azul profundo) en el registro de datos del cultivo celular.
10. **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!

Calcular las células/ml y el porcentaje de viabilidad celular de los cultivos celulares

Cálculo del número total de células/ml

Células/ml = Número medio de células x Dilución x Factor de multiplicación

- Número medio de células = Contar el número de células vivas en cada cuadrícula pequeña y hacer el promedio.
- Factor de multiplicación = Para convertir en células/ml (para este hemocitómetro utilizar 90.000).
- Dilución = La dilución doble de la suspensión celular antes de pipetear en el hemocitómetro.

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

- Número medio de celdas = $75/9$
- Factor de multiplicación = 90.000
- Dilución = $10 \mu\text{l}/20 \mu\text{l}$ de volumen final = $1/2$ = dilución de 2 veces

Para calcular células/ml = $75/9 \times 90.000 \times 2 = 1,5 \times 10^6$ células/ml

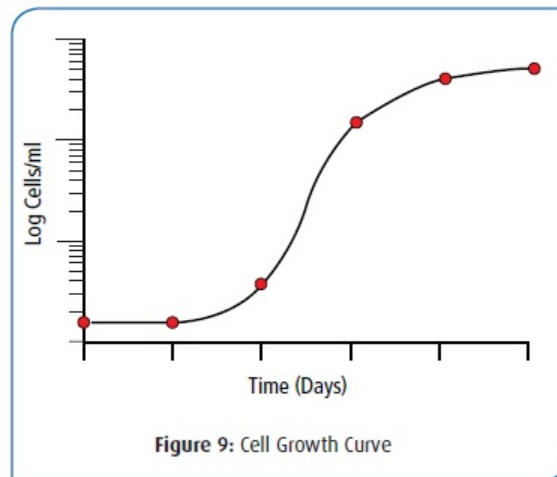
Cálculo del porcentaje de viabilidad de células

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

Por ejemplo: De las 75 células que se cuentan, 70 son brillantes y 5 son de color azul profundo.

Para calcular la viabilidad = $70/75 \times 100 = 93.3\%$ Viabilidad

B. DIBUJAR LA CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS



1. **REALIZAR** un conteo celular y un ensayo de viabilidad como se describe en la sección anterior cada 48-72 horas hasta que no se detecte cambio en el número de células/ml del cultivo (fase estacionaria). Utilice un pocillo nuevo en el hemocitómetro para cada medición.

NOTA: Normalmente se tardará de 7 a 10 días en llegar 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 cuadrículado logarítmico o un programa gráfico de ordenador, **REGISTRAR/DIBUJAR** las concentraciones celulares (células/ml) en una escala logarítmica en función del tiempo (en días) de cultivo.

3. **IDENTIFICAR** e rotular las fases del crecimiento: latencia ("Lag"), crecimiento exponencial (o crecimiento) ("Log") y estacionaria para el cultivo celular.

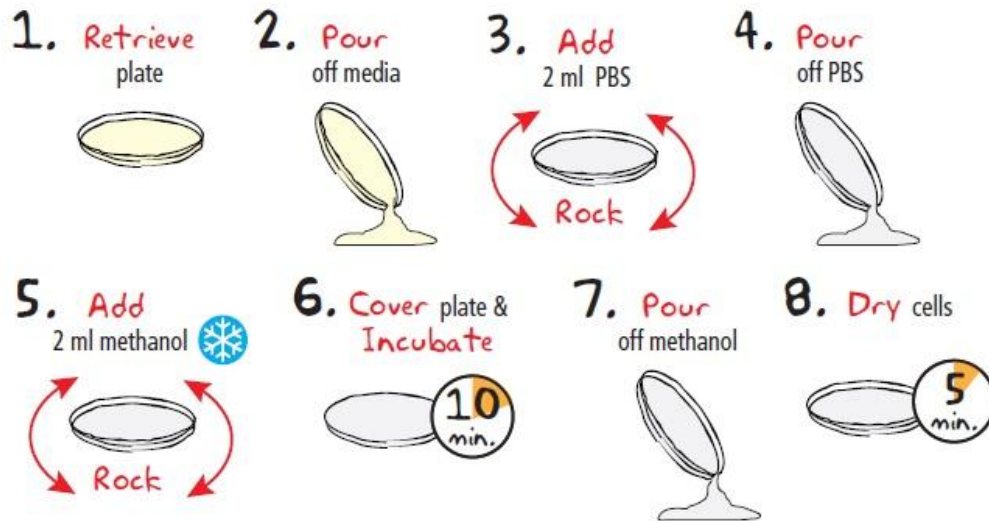
NOTA: La fase de latencia no siempre se ve en cultivos de rápido crecimiento.

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.

5.5 Módulo V: Ensayo de tinción diferencial utilizando colorante de Giemsa

Las células se tratan comúnmente con colorante para teñir las características de la célula, haciendo posible distinguir hasta los detalles más pequeños. El colorante de Giemsa, una mezcla de azul de metileno y eosina, tiñe la membrana y el núcleo azul y el citoplasma azul claro o morado. Este [Módulo](#) debe realizarse cuando las células en la placa "[Módulo V](#)" cuando tienen al menos 70% de confluencia, normalmente 3-4 días después de depositar las células en el frasco al realizar el "[Módulo III](#)".

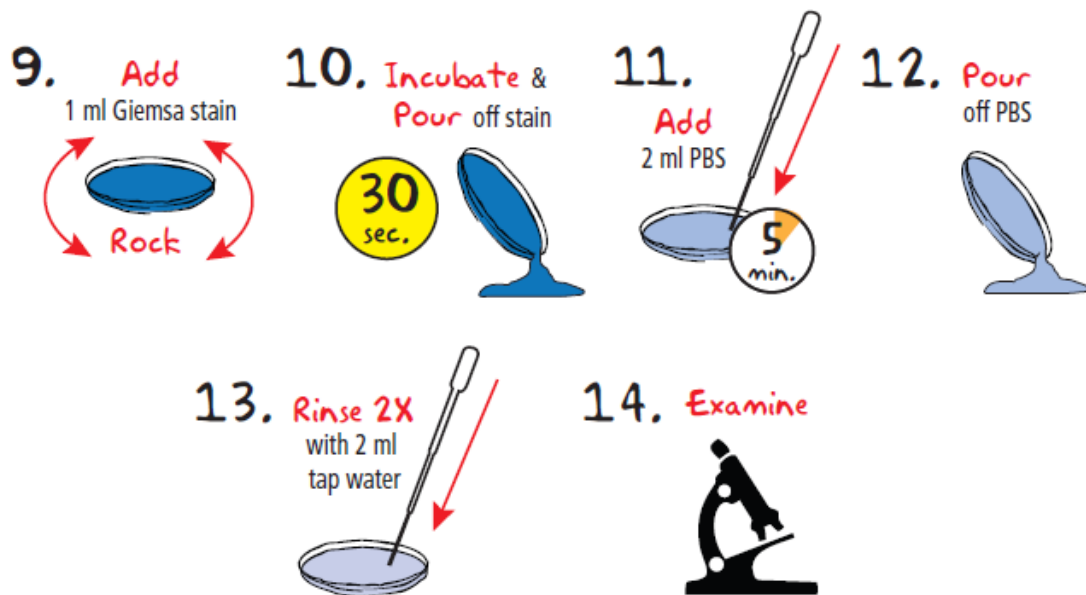
OBSERVAR LAS CÉLULAS TEÑIDAS BAJO EL MICROSCOPIO



1. **RECUPERAR** la placa de células del “[Módulo V](#)” de la incubadora y observar las células usando un microscopio. Las células deben estar sanas y unidas a la placa.

NOTA: Para este procedimiento, no hay necesidad de una técnica aséptica, pero es importante seguir trabajando con las prácticas estándar de seguridad en el laboratorio.

2. **DESECHAR** el medio de cultivo de la placa en un contenedor de residuos.
3. **AÑADIR** 2 ml de PBS y mueva suavemente la placa para lavar las células.
4. **DESECHAR** el PBS de la placa en un contenedor de residuos.
5. Utilizando una pipeta de transferencia, **AÑADIR** suavemente 2 ml de metanol enfriado (helado) a la placa y mueva suavemente la placa para cubrir toda la superficie.
6. **TAPAR** la placa e **INCUBAR** las células para fijarlas durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. **DESECHAR** el metanol en un contenedor de residuos.
8. **SECAR** las células, quitando la tapa de la placa, durante 5 minutos en la poyata del laboratorio.



9. Para teñir las células, **AÑADIR** 1 ml de colorante Giemsa en la placa y mover suavemente la placa para cubrir las células.

10. **INCUBAR** la placa durante exactamente 30 segundos y luego **DESECHAR** el colorante Giemsa en un contenedor de residuos.

NOTA: Es posible sobreteñir las células si el colorante Giemsa se deja más de 30 segundos.

11. **AÑADIR** 2 ml de PBS a la placa e **INCUBAR** durante 5 minutos.

12. **DESECHAR** el PBS de la placa en un contenedor de residuos.

13. **LAVAR** la placa dos veces con 2 ml de agua del grifo. **DESECHAR** el agua e inmediatamente transferir la placa a un microscopio.

14. Usando un microscopio de campo brillante, **EXAMINAR** la morfología de las células mientras todavía están húmedas. Observar la tinción diferencial del núcleo y el citoplasma. Dibujar una imagen representativa de las células en su cuaderno de laboratorio, tomando nota del color y la intensidad de la tinción.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL

Se puede dejar que las placas se sequen al aire y luego se pueden almacenar a temperatura ambiente durante una semana. Para visualizar, humedecer suavemente la placa con agua del grifo como en el paso 13 y examinarlas.

6. 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 70-80%?

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?

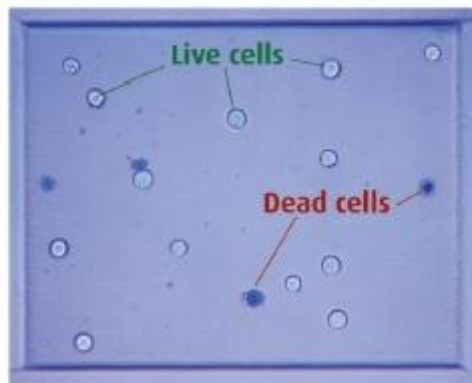
7. RESULTADOS DE LA PRÁCTICA Y ANÁLISIS

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

MÓDULO IV-

A. CONTAR LAS CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS

Figure 10: Trypan blue staining of cells



Cálculo del número total de células por ml de cultivo

Células/ml = Número medio de células vivas x Dilución x Factor de multiplicación.

Utilizando la imagen de la Figura 10:

- Número medio de células vivas = 13
- Dilución = $10 \mu\text{l}/20 \mu\text{l}$ de volumen final = $\frac{1}{2}$ = dilución de 2 veces
- Factor de multiplicación = 90.000

Para calcular células/ml = $13 \times 90.000 \times 2 = 2,34 \times 10^6$ células/ml

Cálculo del porcentaje de viabilidad de las células

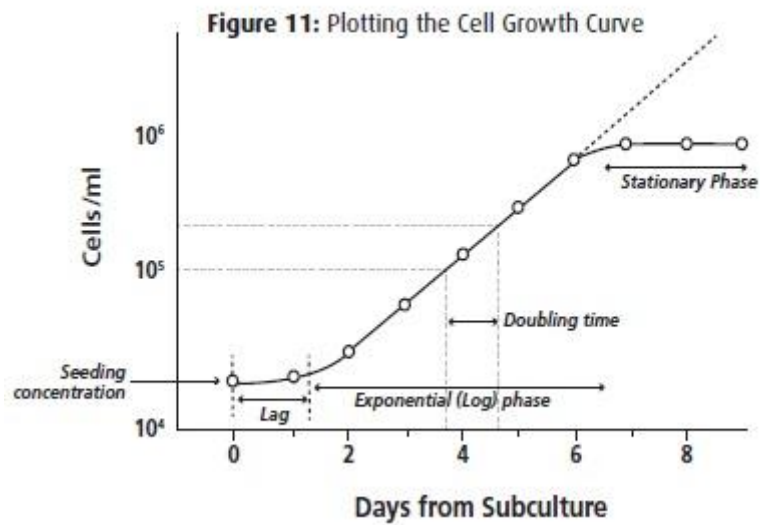
Viabilidad = $(\text{N}^\circ \text{ de células viables} / \text{N}^\circ \text{ total de células contadas}) \times 100$

Utilizando la imagen de la Figura 10:

- Células vivas (brillantes) = 13
- Total de células contadas = 17

Para calcular la viabilidad = $(13/17) \times 100 = 76.5\%$ Viabilidad

B. DIBUJAR LA CURVA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS



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.

MÓDULO V-

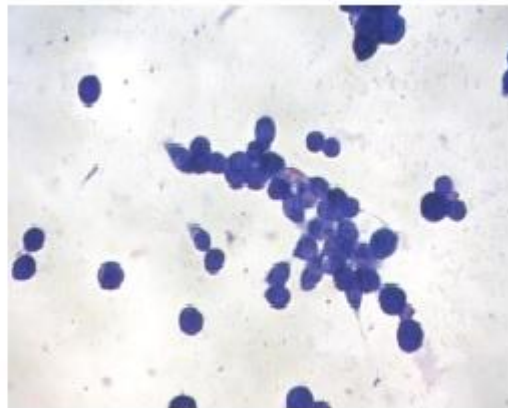
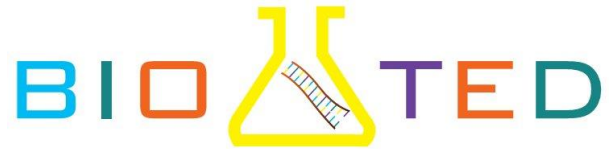


Figure 12: Giemsa stained Sf9 cells

La Figura 12 es una imagen de una muestra de células teñidas con colorante Giemsa. Esta imagen representa los resultados típicos obtenidos de células Sf9 sanas. Los resultados de los estudiantes pueden ser diferentes debido a las variaciones en la preparación celular y la intensidad de la tinción.



Registro de datos del cultivo (subcultivo) celular

Grupo:		Nombre de estudiantes:									
Fecha											
Estado de salud del cultivo celular	Apariencia de las células										
	Claridad del medio de cultivo										
	Confluencia (densidad de las células)										
Subcultivos	Volumen final en el frasco nuevo (ml)										
	Volumen de células (ml)										
	Relación de dilución de las células										
Recuento de células	Promedio de células vivas por rejilla										
	Promedio de células muertas por rejilla										
	Total de células por rejilla										
	Células vivas en el frasco (#vivas x volumen)										
	% viabilidad (#vivas/#muertas)										
	Fase del ciclo de crecimiento										
OBSERVACIONES:											