

DETECCIÓN DE FIBRAS DEL CITOESQUELETO MEDIANTE FLUORESCENCIA

1. OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS

El objetivo de estas prácticas es ofrecer a los estudiantes una herramienta experimental para la detección de fibras del citoesqueleto, utilizando el microscopio de fluorescencia.

2. MATERIAL Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Componentes	Envío	Conservación
Células de insecto (Sf9).	1 vial	T.A.
Medio de cultivo de las células de insecto	16 ml	4 °C
Medio de fijación	6 viales	4 °C
Medio de permeabilización	6 viales	T.A.
Frasco cultivo celular (estériles, 25 cm ²)	1 unid	
Cubres tratados (estériles)	6 unid	
Placas de 35 mm (estériles)	6 unid	
Tampón fosfato	18 ml	4 °C
Portaobjetos	6 unid	
Pipetas de 10 ml (estériles)	4 unid	
Pipetas pasteur punta fina	42 unid	
Rascadores (estériles)	1 unid	
Cámaras de recuento celular	1 unid	
Faloidina-TR	1 unid	4 °C
Medio de montaje	1 unid	
Tubos de 15 ml	1 unid	
Tubos de 50 ml	1 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 con un mínimo de 2 semanas de antelación de la fecha prevista del inicio de las prácticas. Las células de insecto se deben **cultivar inmediatamente** después de su recepción (ver protocolo anexo 3).

NOTA: El **Medio de Cultivo de las células de insecto (MC)**, el **Medio de fijación**, el **tampón fosfato** y el **vial que contiene la faloidina-TR** 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 de una cámara de incubación, 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 e isopropanol.
- 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).
- Microscopio de fluorescencia **con filtro para TRITC**.
- Micropipeta de 10-1000 µl y puntas.
- Rotuladores marcadores.
- Gafas de seguridad, mascarilla (opcional), guantes de laboratorio desechables y batas de laboratorio.
- Contenedores de residuos (vasos de precipitado).
- Pinzas de punta fina -estériles-
- Agujas enmangadas -estériles-

NOTA: *El microscopio invertido se utiliza para la observación de las células en cultivo (en frasco o en placa). Para la observación y conteo 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 toscas preparaciones 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 supresión de genes o detectar terapias eficaces.

El cultivo de células de insectos Sf9



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

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 cogollero, *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.

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

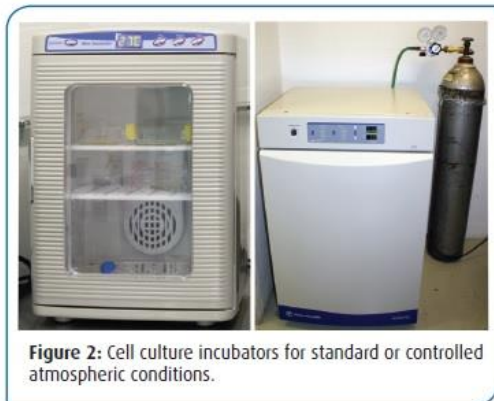


Figure 2: Cell culture incubators for standard or controlled atmospheric conditions.

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.

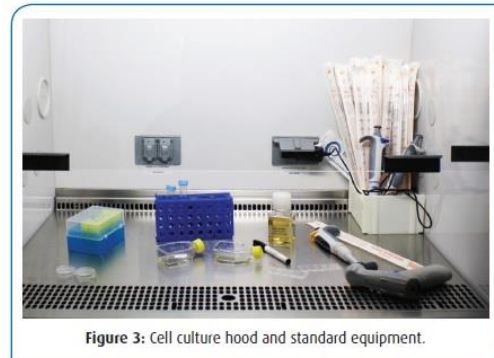


Figure 3: Cell culture hood and standard equipment.

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 en 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, además de antibióticos, para ayudar a reducir las posibilidades de infección bacteriana.

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

Muchas características celulares son visibles usando un microscopio compuesto estándar. 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 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.

Citoesqueleto

El citoesqueleto está compuesto por diferentes tipos de proteínas filamentosas entre las que se encuentra **la actina**, una proteína citosólica que representa cerca del 10% de las proteínas presentes en el citosol celular. Se encuentran dos tipos de la proteína actina, la denominada actina G - globular y despolimerizada- y, cuando esta se polimeriza, forma la actina F o filamentososa, implicada en diversidad de procesos celulares, siendo la responsable de conferir la forma a la célula.

El **citoesqueleto** es una estructura dinámica y es este dinamismo el que permite a la célula su movimiento, la señalización celular, la división celular, la endocitosis, la fagocitosis, comunicación entre orgánulos celulares, etc.

Los procesos de polimerización y despolimerización de la actina intervienen en todos los procesos celulares nombrados anteriormente. Esto significa que, continuamente, se forma actina filamentososa y esta se despolimeriza a la forma globular de la actina. Los filamentos de actina se acortan o bien se alargan mediante estos ciclos dinámicos de polimerización/despolimerización.

La detección de la actina filamentososa (fibras de actina o fibras de estrés) se realiza mediante la utilización de una toxina presente en el hongo *Amanita phalloides*.

Aislada por primera vez en la década de los años 30 del siglo XX, la faloidina es una falotoxina producida por este hongo. Su intoxicación produce la denominada hambre aguda, debido a la destrucción que causa en las células del hígado.

El mecanismo de intoxicación de la faloidina, reside en su unión de forma específica con los filamentos de actina del citoesqueleto, característica por la cual es una herramienta muy útil en la detección de las fibras de actina.

Existen derivados de la faloidina que están conjugados con cromóforos, sustancias sensibles a absorber y emitir luz en una franja determinada de longitud de onda.

Estas faloidinas se utilizan en la detección y estudio del citoesqueleto mediante el uso de microscopios de fluorescencia.

4. PRÁCTICAS A REALIZAR CON EL PRESENTE KIT:

Las prácticas se dividirán en 3 módulos:

- **Módulo I:** *Observación y evaluación del estado del cultivo 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 realizar un cambio de medio de cultivo por otro fresco, que contiene los nutrientes esenciales necesarios. Normalmente, las células deben alimentarse cada 3-5 días y resembrar (subcultivo), preferentemente, cuando existe una confluencia del 80-90%.

- **Módulo II:** *Siembra de células Sf9 en cubreobjetos*

En este módulo, los estudiantes aprenderán a manejar un cultivo celular, hacer la resiembra sobre cubreobjetos que permita su crecimiento y llevarlo a las condiciones óptimas para realizar ensayos de inmunocitología.

- **Módulo III:** *Detección de las fibras de actina mediante fluorescencia*

En este apartado, los estudiantes aprenderán la técnica básica para realizar detecciones mediante fluorescencia, utilizando el microscopio.

EL LABORATORIO DE PRÁCTICAS

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 sujeto -preferiblemente bajo un gorro de laboratorio- 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. Ante la duda de haber tocado cualquier zona no estéril, **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 para (a) tener fácil acceso a todo el material que vamos a utilizar, con el mínimo de manipulación posible para alcanzar todo lo necesario para realizar la práctica 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) con ayuda de 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 esté siempre en contacto con la vista y no oculta tras uno de los brazos. Asegurarse de que la pipeta esté inclinada 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 ser retiradas de su cubierta protectora de plástico, en una zona estéril (bajo la campana) e inmediatamente antes de su uso.
4. **LIMPIAR** inmediatamente, con papel secante, cualquier derrame de líquido, 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 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 eucarióticas. 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.



MÓDULO I: Observación y evaluación del estado del cultivo celular

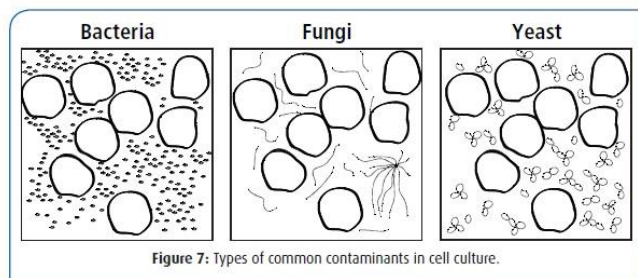
GENERALIDADES

Es necesario habituarse a examinar el cultivo celular antes de realizar cualquier experimento. Durante la observación microscópica de las células, podremos determinar el estado de salud de las mismas y controlar que el cultivo esté libre de contaminación.

ÚNICAMENTE podremos iniciar el experimento cuando estemos seguros de que las células están creciendo en condiciones óptimas.

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.

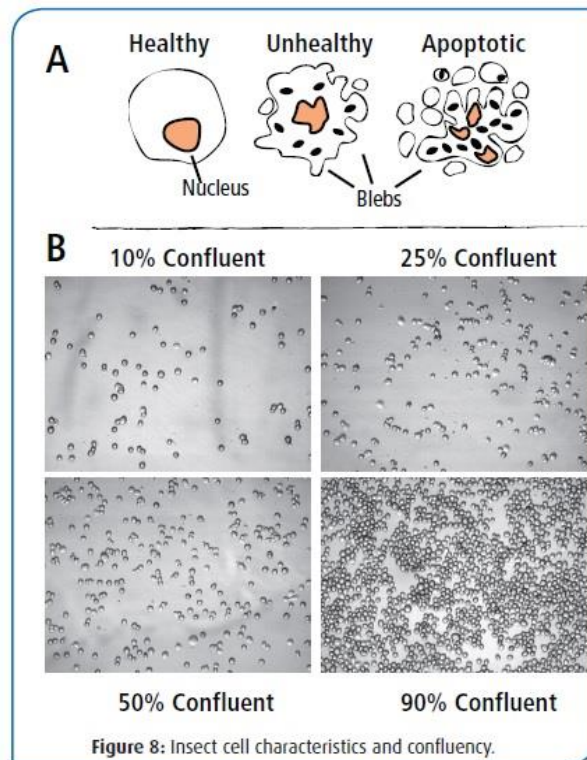
ES MUY IMPORTANTE examinar las células de insectos antes de cada experimento de cultivo celular para asegurar que estén sanas y libres de contaminación (condiciones óptimas). Las células insalubres y apoptóticas mostrarán un aumento de las partículas pequeñas (denominadas gránulos), la formación de vacuolas, 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** el frasco de cultivo de células de la incubadora y llevarla a la zona de trabajo del laboratorio.

Recordar que es necesario limpiar previamente la zona 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 que esté turbio, indica contaminación microbiana.



3. **EXAMINAR** las células bajo un microscopio. Buscar signos de células enfermas que podrían indicar que ha disminuido drásticamente la cantidad de nutrientes presente en el medio y este necesita ser cambiado o bien que las células han llegado a una confluencia superior al 80% y deben ser subcultivadas.

NOTA: Si el cultivo de células está contaminado, añadir al frasco, inmediatamente, 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

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 más tiempo para crecer y necesitan ser alimentadas o bien si están al 80%-90% de confluencia y necesitan ser amplificadas (resiembra).

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: Siembra de células Sf9 en cubreobjetos

MATERIAL NECESARIO

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

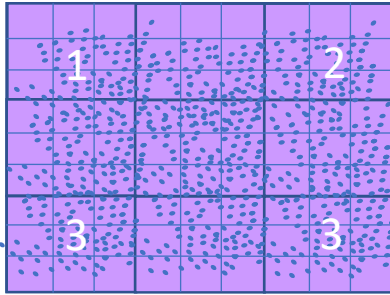
☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Cubreobjetos pretratados para la adhesión de células Sf9 (estériles)
☐ Medio de cultivo completo	☐ Rascadores de placas
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Cámara de Neubauer	☐ Tubos de 15 ml (estériles)
☐ Placas de cultivo de 35 mm	☐ Pipetas de 10 ml (estériles)
☐ Pinzas de punta fina (estériles)	☐ Tubos de 50 ml (estériles)

Una vez observamos el cultivo celular y vemos que no hay contaminación celular, cogemos el frasco de células (25 cm², tapón verde) y procedemos a resembrarlas en cubreobjetos estériles que han sido pretratados para optimizar la adherencia celular. Previamente a la siembra, se ha colocado 1 cubreobjetos por placa de 35 mm, en condiciones estériles.

Protocolo:

1. **Levantar** las células adheridas al frasco de cultivo con ayuda de un rascador estéril.
2. **Resuspender** las células con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml y añadirlas a un tubo estéril de 15 ml.
3. **Coger** unos 12 µl, aprox, del homogenado celular y depositarlo en una de las 10 cámaras de conteo de la placa de Neubauer.
4. Con ayuda del microscopio, **contar** las células que hay en cada una de las zonas de los extremos de la cámara (en cada una de las cuatro esquinas de la cámara hay 9 cuadrados pequeños).

5. **Obtener** el número de células por mililitro de homogenado:



$$\begin{aligned} n^{\circ} \text{ medio de células} &= \\ &= \frac{n^{\circ} \text{ de células totales en las 4 zonas}}{4 \text{ zonas}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n^{\circ} \text{ células/ml} &= n^{\circ} \text{ medio de células} \times \\ &\times \text{factor de dilución} \times \text{factor multiplicación} \end{aligned}$$

Ejemplo:

Nº medio de células = 110

Factor de dilución = 1

Factor multiplicación = 4500

$$110 \times 1 \times 4500 \sim (495000 \text{ células}) / \text{ml}$$

6. **Ajustar el volumen del homogenado** añadiendo medio de cultivo hasta alcanzar la densidad necesaria, atendiendo a la siguiente información:

Entre los seis grupos tenemos 6 placas de 35 mm, por lo que **necesitamos:**

0,25 millones de células/placa x 6 placas = **1,5 millones de células.**

3 ml de medio de cultivo/placa x 6 placas = **18 ml de medio de cultivo totales.**

En la preparación del homogenado celular utilizaremos un tubo de 50 ml. El tubo contendrá un volumen final de homogenado de 18 mililitros de medio de cultivo que incluirá un total de 1,5 millones de células, **necesario para realizar las prácticas.**

IMPORTANTE: En nuestro ejemplo, si **en un tubo** tenemos una concentración de 0,495 M células / ml y necesitamos un total de 1,5 millones de células, debemos tomar, aproximadamente, 3 ml del homogenado celular.

Con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml, pondremos 3 ml del homogenado celular en un tubo de 50 ml y añadiremos 15 ml de medio de cultivo, con ayuda de otra pipeta estéril de 10 ml, para obtener los 18 ml del homogenado celular que necesitamos para las 6 placas que contienen los cubreobjetos pretratados.

$$\text{Volumen de medio a añadir} = 18 \text{ ml (Vtotal)} - 3 \text{ ml (Vhomogenado celular)}$$

Volumen de medio a añadir = 15 ml de medio completo

Una vez tengamos los 18 ml que incluyen 1,5 M de células, homogenamos suavemente con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml y depositamos 3 ml en cada una de las placas de cultivo y las agitamos suavemente antes de depositarlas en el incubador.

TENER EN CUENTA que, para utilizar los datos del ejemplo, ES NECESARIO ajustar la concentración inicial de células a 0,5 M / ml, aproximadamente.

7. Con ayuda de unas pinzas estériles, **colocar** un cubreobjetos estéril pretratado para el cultivo de células Sf9 dentro de una placa de 35 mm estéril.
8. **Sembrar** las placas de cultivo de 35 mm, también en un ambiente estéril/bajo la campana, añadiendo 3 ml del homogenado celular en cada una de las placas. **Realizar** este paso con suavidad, añadiendo gota a gota sobre el cubreobjetos y dejar que el homogenado se extienda en la placa. La densidad celular es de 0,25 millones de células/placa.
9. **Incubar** las células a 27°C hasta conseguir una confluencia del 75-80%.

Módulo III: Detección de las fibras de actina mediante fluorescencia.

MATERIAL NECESARIO

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

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Pipetas estériles pasteur
☐ Tampón fosfato	☐ Medio de fijación
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Medio de permeabilización	☐ FaloidinaTR
☐ Placa de Petri	☐ Parafilm
☐ Portaobjetos	☐ Medio de montaje
☐ Pinzas	

Antes de iniciar la ejecución de este módulo, debemos observar al microscopio cada una de las placas de cultivo celular y anotar en nuestra libreta de laboratorio el estado en el que se encuentran.

Esta sección de prácticas puede realizarse encima de la mesa de laboratorio ya que no son necesarias mantener las condiciones de esterilidad.

Protocolo:

1. **Colocar** el Parafilm en el interior de la placa de Petri de 10 cm. Para ello, recortar el Parafilm en una extensión suficiente como para que no sobresalga el cubreobjetos en el que tenemos las células.
2. **Levantar** el cubreobjetos suavemente, con mucho cuidado y con ayuda de unas pinzas de punta fina. Con mucho cuidado, **colocar** el cubreobjetos encima del Parafilm que hemos puesto en las placas de Petri de 10 cm. **La cara del cubreobjetos en el que se encuentran las células adheridas NO DEBEN ponerse boca abajo en contacto con el Parafilm.**

3. Con ayuda de una pipeta pasteur colocada en un vértice del cubreobjetos, **aspirar** el medio de cultivo que aún queda residual sobre el cubreobjetos y descartarlo.
4. **Añadir** unos **200 microlitros**, aprox, **de tampón fosfato** hasta que se cubra el cubreobjetos y dejarlo durante 5 minutos.
5. **Repetir este proceso de aspiración de medio y adición de tampón fosfato durante 5 minutos, un total de 3 veces.**
6. Después de aspirar el tampón fosfato por última vez, **AÑADIR** unos **200 microlitros de medio de fijación, cubriendo la totalidad de las células presentes en el cubreobjetos. Dejarlo durante 10 minutos.**
7. **Aspirar** el medio de fijación y descartarlo.
8. **Añadir** unos **200 microlitros de tampón fosfato** hasta que se cubra el cubreobjetos y dejarlo durante 5 minutos.
9. **Repetir este proceso de aspiración de medio y adición de tampón fosfato durante 5 minutos, un total de 3 veces.**
10. Después de aspirar el tampón fosfato por última vez, **AÑADIR** unos **200 microlitros de medio de permeabilización, cubriendo la totalidad de las células presentes en el cubreobjetos. Dejarlo durante 5 minutos**
11. **Aspirar** el medio de permeabilización y descartarlo.
12. **Añadir** unos **200 microlitros de tampón fosfato** hasta que se cubra el cubreobjetos y dejarlo durante 5 minutos.
13. **Repetir este proceso de aspiración de medio y adición de tampón fosfato durante 5 minutos, un total de 3 veces.**
14. Durante la última incubación con el tapón fosfato, sacar el microtubo de la nevera que contiene la faloidina y darle un golpe de centrífuga. Seguidamente, **añadir** 200 microlitros de tampón fosfato en el interior del microtubo eppendorf. **Resuspender** la faloidina suavemente, con ayuda de la micropipeta.
15. **Aspirar** el tampón fosfato y **AÑADIR** con cuidado los 200 microlitros de la solución que contiene la faloidina, gota a gota. **Dejar** durante 10 minutos.
16. **Aspirar** el medio que contiene la faloidina y descartarlo.
17. **Añadir** unos **200 microlitros de tampón fosfato** hasta que se cubra el cubreobjetos y dejarlo durante 5 minutos.
18. **Repetir este proceso de aspiración de medio y adición de tampón fosfato durante 5 minutos, un total de 3 veces.**
19. **Coger** el cubreobjetos con las pinzas y con cuidado, poner en contacto una de las esquinas sobre papel de filtro para que no quede tampón en el cubreobjetos. **Depositar suavemente** el cubreobjetos sobre el portaobjetos, **de forma que el portaobjetos esté en contacto con las células y el medio de montaje. Añadir** 1-2 gotas de medio de montaje sobre el portaobjetos.

NOTA: El portaobjetos debe de estar limpio de impurezas. Lavar con jabón de lavaplatos y aclararlo con agua del grifo. Añadir un chorro de etanol 70% y después agua destilada. Por último, decantar el exceso de agua y limpiar la humedad del portaobjetos con papel secante, libre de impurezas.

20. Observación al microscopio de fluorescencia con el filtro para TRITC.

21. **Anotar** los resultados en el cuaderno de prácticas -soportado con fotografías-

ANEXO 1: PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

1. ¿Por qué se recomienda subcultivar las células al alcanzar una confluencia de 80 – 90%?
2. Describir los síntomas comunes de la contaminación bacteriana.
3. ¿Para qué sirve el Parafilm que hemos colocado en la placa de Petri?
4. ¿Por qué utilizamos una solución de fijación celular?
5. ¿Por qué utilizamos una solución permeabilizadora?
6. ¿Por qué utilizamos la faloidinaTR?

ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PRÁCTICA Y ANÁLISIS

La observación al microscopio de fluorescencia requiere de la eliminación de cuerpos extraños a los que se pueda unir el cromóforo que estamos utilizando, cuyo resultado sería una fluorescencia inespecífica y enmascararía la observación de la diana específica para la cual utilizamos el marcador (fibras de actina).

La observación difusa al microscopio de fluorescencia puede ser debido a no haber respetado el protocolo de lavados con el tampón fosfato, aunque no haber incubado las células con el medio de fijación o bien el medio de permeabilización, pudiera tener como consecuencia la visualización de una fluorescencia inespecífica.

Es importante que se haya eliminado la grasa y las impurezas del portaobjetos ya que pudieran enmascarar la señal específica de fluorescencia.

Un efecto que podría causar que no se observara el marcaje con fluorescencia pudiera ser debido a la ausencia de células -por haber incubado el cromóforo en la cara del cubreobjetos en el que no hay células- o bien por haber diluido la faloidina en exceso. ES IMPORTANTE respetar el protocolo.

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 el tubo que contiene las células en un frasco de cultivo de 25 cm² (con tapa verde).

El contenido celular de un frasco al 80-90% de confluencia, es suficiente para que realicen la práctica los seis grupos de alumnos.

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.

c) Durante las prácticas

Recordar que los alumnos deben observar el estado de las células, antes y después de la incubación, como paso previo a realizar el protocolo de detección de la actina.

Organización e implementación previas de la práctica

Las instrucciones que se presentan en este protocolo son las indicadas para realizar las prácticas en 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 participar en este experimento.**

Los estudiantes deben ser cuidadosos con el uso del medio de fijación, con el medio de permeabilización y con la faloidina. Siempre deben utilizar guantes para evitar el contacto directo con estos medios.

Esterilización de equipos y materiales

1. Desinfectar la mesa 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 neutralizados 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 tratarla 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 tres módulos y debe durar aproximadamente de una a dos semanas. La siguiente tabla es una guía para la implementación de esta práctica, que puede ser adaptada a las circunstancias específicas de cada clase.

Módulo	Preparaciones previas	Parte práctica
<u>I</u>	15 min	15-30 min
<u>II</u>	10-15 min	30 min
<u>III</u>	15 min	90-120 min

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: Siembra de células Sf9 en cubreobjetos	Preparar y distribuir los materiales	Al inicio de la práctica	5 min
Módulo III: Detección de las fibras de actina mediante fluorescencia	Preparar y distribuir los materiales. Disponer del microscopio de fluorescencia	Treinta minutos antes de realizar la práctica	15-20 min

Recomendamos preparar el equipo y los reactivos correspondientes antes de comenzar la práctica con los estudiantes. Tener preparado un microscopio para la observación y análisis celular a lo largo de todos los Módulos. Disponer del microscopio de fluorescencia a la finalización del Módulo III.

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 en 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 insecto 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) Inicio del cultivo de las células recibidas

Las células de insecto Sf9 se envían en un vial que se debe transferir a un frasco de 25 cm² tan pronto como se reciban.

1. **ATEMPERAR** el medio de cultivo de células de insecto a temperatura ambiente.
2. **AÑADIR** con una pipeta estéril de 10 ml, un volumen de **1 ml** de medio de cultivo de células de insecto al frasco de cultivo de 25 cm²-, manteniéndolo 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** el volumen del vial de células de insecto Sf9 al frasco (estéril) de cultivo celular al que ya hemos añadido 1 ml de medio de cultivo.

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

5. **INCUBAR** horizontalmente 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, 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 4 ml de medio de cultivo de células de insecto nuevo precalentado a 27°C o atemperado en el mismo laboratorio.

Las células deben de llegar al menos al 85% 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.

Cada grupo necesita:

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%

PREPARACIÓN MÓDULO II: SIEMBRA DE CÉLULAS Sf9 EN CUBREOBJETOS

1. **SACAR** de la nevera el medio de cultivo de las células de insecto y dejarlo calentar a temperatura ambiente.

2. **REPARTIR** el material indicado para la realización de este módulo.

Cada grupo necesita:

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Pipetas estériles pasteur
☐ Medio de cultivo completo	☐ Rascadores de placas

☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Cámara de Neubauer	☐ Tubo de 15 ml (estéril)
☐ Placas de cultivo de 35 mm	☐ Pipetas de 10 ml (estériles)
☐ Tubo de 50 ml (estéril)	☐ Cubreobjetos (estériles)
☐ Pinzas (estériles)	

PREPARACIÓN MÓDULO III: DETECCIÓN DE LAS FIBRAS DE ACTINA MEDIANTE FLUORESCENCIA

1. **REPARTIR** los componentes necesarios para cada grupo.

Cada grupo necesita:

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Pipetas estériles pasteur
☐ Medio de fijación	☐ Medio de permeabilización
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta
☐ Tampón fosfato	☐ FaloidinaTR
☐ Medio de montaje	☐ Pinzas
☐ Placas de Petri	☐ Parafilm
☐ Microscopio de fluorescencia	



Registro de datos

GRUPO
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES
FECHA

