

ESTUDIO DE TOXICIDAD EN CÉLULAS DE INSECTO

1. OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS

El objetivo de estas prácticas es iniciar a los estudiantes en el diseño experimental de un estudio de toxicidad en cultivos celulares.

2. MATERIAL Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Componentes	Envío	Conservación
Células de insecto (Sf9).	2 viales	T.A.
Medio de cultivo de las células de insecto	62 ml	4 °C
Medio de reacción	56 ml	4 °C
Tampón Fosfato Salino (PBS 1x).	28 ml	4 °C
CuSO ₄	2x6 ml	T _a ambiente
ZnSO ₄	2x5 ml	
Colorante azul de tripiano.	1 ml	
Frasco cultivo celular (estériles, 25 cm ²)	2 unid	
Placas de cultivo celular de 12 (estériles)	4 unid	
Pipetas de 10 ml (estériles)	10 unid	
Pipetas pasteur (estériles)	10 unid	
Rascadores (estériles)	5 unid	
Cámaras de recuento celular	7 unid	
Tubos de fondo cónico de 15 ml (estériles)	21 unid	
Tubo de centrifuga de 1,5 ml	104 unid	

Esta práctica está diseñada para que la realicen 4 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 Reacción (MR)** y el **Tampón fosfato salino (PBS)** se deben almacenar inmediatamente en nevera (4°C) después de su recepción.

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

2.1 Material necesario y no incluido en este kit

- Cámara de incubación. En caso de no disponer 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.
- Pipeta con pera de succión o pipeta automática.
- Microscopio invertido de contraste de fases / campo brillante (las células se pueden ver con un microscopio de estudiante en posición vertical, pero está limitado por la altura de las placas de cultivo).
- Micropipeta de 10-1000 µl y puntas.
- Rotuladores marcadores.
- Gafas de seguridad, mascarilla (opcional), guantes de laboratorio desechables y batas de laboratorio.
- Contenedores de residuos (vasos de precipitado).

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

3. INTRODUCCIÓN

El cultivo de células eucarióticas

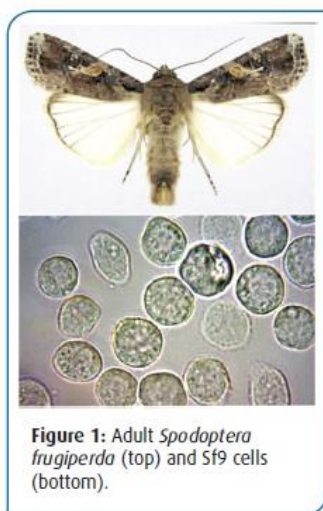
El cultivo celular, la capacidad de crecer y estudiar bacterias, virus y células eucariotas, es una piedra angular de la biología moderna. En experimentos de cultivos celulares, los científicos recrean en un laboratorio el ambiente natural de las células para responder a importantes preguntas biológicas. 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 de la 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 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.

Ensayos de Toxicidad en cultivos celulares

Los ensayos de toxicidad, resultan de gran importancia para evaluar el índice de seguridad de diferentes compuestos y prevenir posibles alteraciones que se puedan generar en los organismos vivos, garantizando su salud y bienestar.

Una de las aproximaciones experimentales más utilizadas ha sido el uso de cultivos celulares. Con ellos se evalúa la potencialidad tóxica de ciertos productos químicos, de medicamentos o de pesticidas. Los resultados obtenidos en estos ensayos con cultivos celulares, ayudan a optimizar el diseño del estudio de estos agentes tóxicos en la experimentación con animales y su aplicación en explotaciones agrícolas, racionalizando el uso de estos y minimizando los efectos derivados de los mismos sobre el bienestar animal.

La incidencia de las sustancias tóxicas en el cultivo celular es muy variable y está relacionada con la potencia tóxica de estas sustancias o compuestos químicos. Así pues, una sustancia extremadamente tóxica puede causar una muerte celular agresiva y rápida. Sin embargo, el estudio de toxicidad a concentraciones inferiores o bien con otras sustancias menos tóxicas, pueden dañar las células sin que provoquen su muerte. El estudio de estos agentes tóxicos nos determinará su cualidad como elementos más o menos peligrosos.

La exposición del cultivo celular frente a diferentes compuestos tóxicos, puede afectar de diferentes maneras a la viabilidad de las células. Así, la observación microscópica de estas células, revela cambios en la forma o estructura celular, indicando que estas células muestran afectación en su estado de salud, incluyendo el crecimiento y la reproducción celular.

Uno de los ensayos utilizados para valorar la potencialidad de la toxicidad de determinadas sustancias y poder compararlas entre ellas, se basa en la determinación de la concentración de la sustancia que causa el 50 % de la mortalidad de las células presentes en el cultivo celular **(LD50)**. En los organismos, este valor se expresa como los miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal del animal, que **causa el 50% de la mortalidad de los animales**.

Una LD50 de una sustancia que sea inferior a la LD50 de otra sustancia, indicaría la menor toxicidad de la primera. Si en un estudio en ratas, la LD50 obtenida para el cloruro sódico es de 300 mg/kg y la LD50 del cianuro es de 10 mg/kg, nos indicaría que, en estos animales, la toxicidad del cianuro es mucho mayor que la del cloruro sódico (sal común).

Por otra parte, la comparación de las LD50 de determinadas sustancias obtenidas en el estudio de una línea celular, no tiene que extrapolarse para otra línea celular diferente. La fisiología de cada tipo celular, puede provocar grandes variaciones en las LD50 de cada una de estas sustancias tóxicas. De igual manera, tampoco se pueden extrapolar los resultados obtenidos en animales de una determinada especie a otra especie diferente.

Una de las aproximaciones experimentales utilizadas en el estudio de toxicidad de una determinada sustancia sobre un cultivo celular, se basa en la determinación de la viabilidad celular residual resultante tras la exposición a la sustancia. **En el caso de los cultivos celulares, la LD50 indica la concentración del agente tóxico que causa la mortalidad del 50% de células presentes en el cultivo.**

Gran número de experimentos sobre viabilidad celular se basan en la capacidad que tienen las células sanas para impedir la incorporación del colorante azul de tripano. Las células que no son viables, incorporan este colorante y, al microscopio, se observa el citoplasma de las mismas teñido de color azul (Figura 4).

En este kit de toxicidad, los estudiantes deberán diseñar y desarrollar un ensayo de toxicidad en células de insecto Sf9. Cada grupo, deberá utilizar una de las sustancias potencialmente tóxicas que se facilitan para su estudio.

Los productos químicos que serán utilizados, deberán aplicarse teniendo en cuenta el factor de dilución que corresponda en cada caso.

La tinción con el colorante azul de tripano se utilizará para contabilizar el número de células viables y el número de células no viables. El cálculo de las LD50 correspondientes, se realizará determinando el porcentaje de células no viables presentes en el cultivo:

$$\frac{\text{células viables}}{\text{células totales (viables + no viables)}} \times 100$$

4. PRÁCTICAS A REALIZAR CON EL PRESENTE KIT:

Las prácticas se dividirán en 4 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:** *Diseño experimental de la toxicidad en células de insecto causada por agentes ambientales*

En este módulo, los estudiantes aprenderán a formular el diseño experimental dirigido a determinar la toxicidad celular inducida por un agente ambiental.

- **Módulo III:** *Manipulación de un cultivo de células. Resiembra.*

En este apartado, los estudiantes manipularán los cultivos de células de insecto y aprenderán a hacer resiembras. Asimismo, aprenderán a valorar la idoneidad fisiológica del cultivo para conseguir unos datos experimentales fiables.

- **Módulo IV:** *Estudio de la exposición de toxinas en los cultivos de células de insecto. Viabilidad celular*

En este apartado los estudiantes aprenderán a desarrollar en el laboratorio la planificación experimental que se ha diseñado para dar respuesta a la hipótesis planteada.

Asimismo, aprenderán a realizar un banco de diluciones de las sustancias objeto de estudio, enfocado a valorar su potencial tóxico en los cultivos de células de insecto.

Además, pondrán en práctica los ensayos de viabilidad celular usando el colorante azul de tripano y el recuento de células que no lo incorporan en su citoplasma (viables) y de las que lo incorporan (no viables), tiñéndose de azul. Obtendrán los valores de LD50 como medida de la potencialidad tóxica.

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

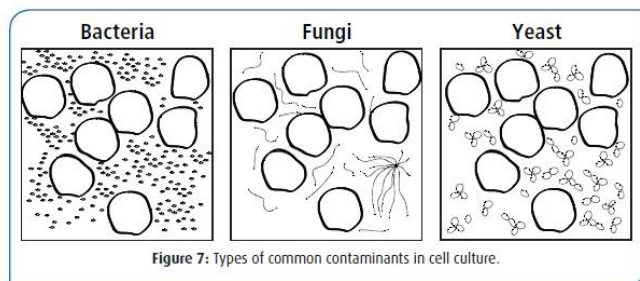
GENERALIDADES

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 crezcan 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.

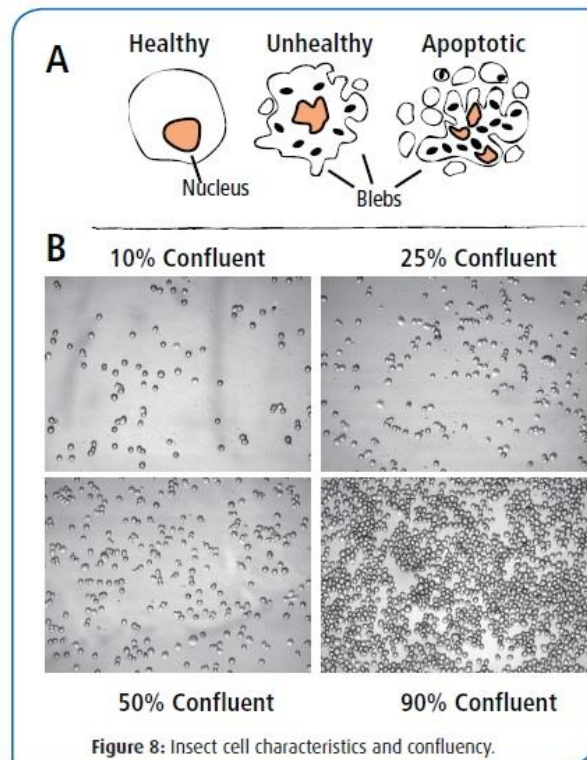
ES MUY IMPORTANTE examinar las células de insectos antes de cada experimento y asegurarnos que estén sanas y libres de contaminación (condiciones óptimas). Las células insalubres y apoptóticas mostrarán un aumento de las partículas pequeñas (denominadas gránulos), la formación de vacuolas, la contracción 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** una placa 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 inmediatamente al frasco 1 ml de solución de lejía al 10%. Después de una hora, como mínimo, desechar el cultivo. Limpiar la incubadora de cultivos celulares con etanol 70% para prevenir la propagación de la contaminación.

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

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

5. **DETERMINAR** si las células requieren 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: Diseño experimental de la toxicidad celular sobre células de insecto causada por agentes ambientales

La realización de un experimento es la culminación de un proceso que persigue dar una respuesta a un planteamiento intelectual a través de una planificación de acontecimientos lógica y ordenada, el diseño experimental.

La secuencia ordenada de todo diseño experimental se basa en:

1. **Establecer** una pregunta a la que se pretenda proporcionar una respuesta.
2. **Formular** una hipótesis de trabajo que permite obtener la respuesta.
3. **Planificar** los experimentos a realizar en la ejecución de la hipótesis planteada.

Es muy importante realizar una búsqueda bibliográfica concisa y de calidad antes de sentarnos a realizar cualquier diseño experimental. Únicamente, a través del conocimiento previo, podemos tener éxito en nuestros experimentos. De ello dependerá para que, tras el análisis de nuestros resultados experimentales, podamos dar respuesta a la pregunta planteada.

La evaluación de la toxicidad provocada en un cultivo celular mediante la acción de unos agentes presentes en el medio, se realiza observando los efectos de estos sobre la viabilidad celular.

Tal y como se ha indicado, antes de iniciar cualquier planteamiento en el laboratorio, es imprescindible hacer un diseño racional y objetivo del desarrollo de los experimentos que debemos implementar.

Observación, información bibliográfica:

Según la información que podemos encontrar en la literatura, las sustancias ambientales objeto de estudio en el kit, el sulfato de cobre (CuSO_4) es utilizado como fungicida en la eliminación de hongos y el sulfato de zinc (ZnSO_4) es utilizado como fertilizante agrícola.

En concreto, nos planteamos si una determinada sustancia ambiental puede ser nociva para la supervivencia de las células de insecto y diseñaremos qué condiciones experimentales se deben plantear para poder dar respuesta a esta proposición.

En el presente kit se adjuntan dos compuestos, el CuSO_4 y el ZnSO_4 , que se han escogido para ser utilizados como posibles agentes tóxicos en la resolución de la cuestión planteada.

Cabe la posibilidad de que ambos agentes o sustancias ambientales tengan algún tipo de repercusión sobre la vida de las células eucariotas.

1. Nos planteamos una pregunta:

¿El CuSO₄ o el ZnSO₄ causan toxicidad en células de insecto?

Para dar respuesta a nuestro planteamiento, hemos escogido como modelo biológico el cultivo de células de insecto.

Puedes hacer una búsqueda de potenciales toxinas ambientales y realizar alguna pregunta sobre cuál de ellas sería interesante para realizar un estudio:

2. Formulamos una hipótesis de trabajo:

En el caso de que el CuSO₄ y el ZnSO₄ ejerzan una acción tóxica sobre estas células, entonces

Concentraciones variables de cada uno de estas moléculas producen una variabilidad sobre la viabilidad de las células de insecto

La formulación de la hipótesis puede ser diversa, aunque debemos elegir una que se ajuste a la demostración práctica que conlleve a dar una respuesta clara a nuestra pregunta. Debemos tener en cuenta la predicción de los resultados que vamos a obtener en el desarrollo experimental de la misma.

Formular algunas hipótesis sobre las preguntas realizadas sobre vuestra búsqueda:

3. Planificamos los experimentos a realizar:

Para determinar los efectos de los agentes tóxicos sobre la viabilidad celular, vamos a realizar una serie de diluciones para cada uno de los agentes tóxicos, escogiendo tres concentraciones diferentes de CuSO₄ y otras tres concentraciones diferentes de ZnSO₄. Los datos obtenidos nos permitirán realizar el cálculo de la LD₅₀ para el CuSO₄ y para el ZnSO₄.

Normalmente, para obtener los mejores resultados en los estudios de sensibilidad de cualquier molécula frente a una actividad biológica, se utiliza un banco de diluciones utilizando una relación de 1:10 en cada dilución.

En nuestro experimento, las condiciones experimentales en las que incubaremos las células, son las siguientes:

CuSO4 0,5 mM	
CuSO4 2 mM	
CuSO4 4 mM	

ZnSO4 0,5 mM	
ZnSO4 1,5 mM	
ZnSO4 3 mM	

Es necesario, en cualquier estudio práctico, establecer una condición experimental en la que el cultivo celular no se haya puesto en contacto con el agente tóxico pero que haya sido manipulado de igual manera que los cultivos tratados.

Control 0 mM	
---------------------	--

Ya que el banco de diluciones lo hemos realizado utilizando el medio de reacción, en la condición experimental de concentración de agente tóxico igual a 0 mM, **o tratamiento control**, el medio de cultivo debe de ser sustituido por medio de reacción. De esta manera, los resultados que obtengamos en las incubaciones celulares con cualquiera de los agentes tóxicos sobre la viabilidad celular, serán debidos, única y exclusivamente, a la acción del agente y no a diferencias existentes en los medios utilizados para incubar las células.

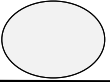
Por último, debemos decidirnos por el número de réplicas a utilizar para cada una de las condiciones experimentales. El objetivo es poder realizar un estudio estadístico con los resultados obtenidos para determinar si las diferencias obtenidas, en cada una de las condiciones experimentales, son significativamente diferentes o no lo son.

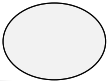
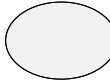
En nuestra planificación, escogemos realizar cada condición experimental por triplicado, incluyendo a los controles.

El diseño experimental debe ser proyectado para conocer la potencia de un agente tóxico, relacionada con el valor de la dosis letal necesaria para producir el 50% de la muerte celular (LD50). Analizando este valor, se puede conocer la potencialidad tóxica de una sustancia y compararla frente a otra.

En resumen, en nuestra planificación experimental para dar respuesta a nuestra hipótesis, utilizaremos tres concentraciones diferentes de cada uno de los agentes tóxicos, utilizando 3 pocillos para cada una de las concentraciones -triplicado-. Debemos operar de igual manera con la condición control.

Recordar que debemos identificar en las placas de cultivo celular, con ayuda de un rotulador permanente, cada una de las situaciones experimentales. Una opción es la que se muestra en el dibujo, en la que se puede trazar una línea horizontal para separar los triplicados e identificar cada una de las concentraciones de la molécula de estudio:

Concentración de CuSO ₄			
CONTROL	0,5 mM	2,0 mM	4,0 mM
			
			
			

Concentración de ZnSO ₄			
CONTROL	0,5 mM	1,5 mM	3,0 mM
			
			
			

Módulo III: Manipulación de un cultivo de células de insecto Sf9. Resiembra

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
☐ Medio de cultivo	☐ Rascadores de placas
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Cámara de Neubauer	☐ Tubos de 15 ml (estériles)
☐ Placas de cultivo de 12 pocillos	☐ Pipetas de 10 ml (estériles)

La práctica de toxicidad, se desarrollará utilizando 1 placa de cultivo de 12 pocillos por grupo. En cada una de las cuatro placas se sembrará las células contenidas en los dos frascos de 25 cm², a la densidad especificada.

Antes de proceder a contar las células, **ES IMPORTANTE** comprobar que el cultivo se encuentra al 80 - 90% de confluencia, aproximadamente.

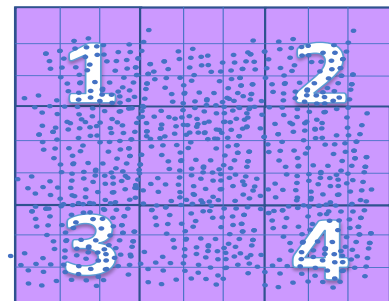
*Los alumnos deben de ser conscientes de la relevancia de **mantener en todo momento un ambiente de esterilidad**. Debemos utilizar alcohol de 70% para limpiar todas las superficies y protegernos las mangas de la bata para evitar contaminaciones al tocar cualquier zona estéril, incluyendo las placas de cultivo. Antes del inicio de la práctica, **DEBEMOS lavarnos las manos** con jabón y evitar el contacto con cualquier superficie no estéril.*

1. **Rociar** el frasco que contiene el cultivo de células con alcohol 70%.
2. **Rascar** con suavidad las células adheridas al suelo del frasco de tapón verde (25 cm² de superficie) con ayuda del rascador estéril **-el cultivo se encuentra al 80 - 90% de confluencia, aproximadamente-**.

3. **Resuspender** las células suavemente utilizando una pipeta pasteur estéril y depositarlas en un tubo de 15 ml. Invertir suavemente el tubo 3-4 veces para que la densidad celular sea homogénea.
4. Del tubo en el que hemos recolectado las células de los dos frascos, **Repartir** el volumen celular en cuatro tubos de 15 ml -un tubo para cada grupo-.
5. **Añadir** 12-15 microlitros de la suspensión celular en uno de los pocillos de la cámara Neubauer.
6. 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).
7. **Obtener** el número de células por mililitro de homogenado:

$$n^{\circ} \text{ medio de células} =$$

$$= \frac{n^{\circ} \text{ de células totales en las 4 zonas}}{4 \text{ zonas}}$$



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

Ejemplo:

Nº medio de células = 115

Factor de dilución = 1

Factor multiplicación = 4500

$$115 \times 1 \times 4500 \sim (0,52 \text{ Millones de células}) / \text{ml}$$

8. **Ajustar el volumen del homogenado** añadiendo medio de cultivo hasta alcanzar la densidad necesaria. Previamente y antes de proceder, **LEER** el ejemplo descrito más abajo.
9. **Sembrar** las placas de cultivo de 12 pocillos bajo la campana, a una densidad de 300000 células/pocillo. El volumen final de medio de cultivo en cada pocillo debe de ser de 1 ml.

Ejemplo:

En cada placa de cultivo tenemos 12 pocillos, por lo que necesitamos:

0,3 millones de células / pocillo x 12 pocillos = 3,6 millones de células por placa.

1 ml de medio de cultivo / pocillo x 12 pocillos = 12 ml de medio de cultivo por placa.

IMPORTANTE: En nuestro ejemplo, si tenemos una concentración de 0,52 M células / ml y para cada placa necesitamos una cantidad de 3,6 M, debemos tomar aproximadamente 6,9 ml del homogenado celular.

Además, como en cada placa necesitamos 12 ml de medio de cultivo, 6,9 ml corresponden al volumen de células.

$$\text{Volumen de medio a añadir} = 12 \text{ ml } (V_{\text{total}}) - 6,9 \text{ ml } (V_{\text{homogenado}})$$

$$\text{Volumen de medio a añadir} = 5,1 \text{ ml de medio completo}$$

Una vez tengamos los 12 ml que incluyen 3,6 M de células, homogenamos suavemente con ayuda de una pasteur y depositamos 1 ml en cada uno de los 12 pocillos de la placa. Suavemente, agitamos la placa para distribuir las células en cada pocillo y la depositamos en el incubador.

TENER EN CUENTA que, para utilizar los datos de este ejemplo, ES NECESARIO ajustar la concentración inicial de células a 0,52 M / ml.

10. **Incubar** las células a 27°C hasta conseguir una confluencia del 80-85%.

Módulo IV: Estudio de la exposición de toxinas en los cultivos de células de insecto. Viabilidad celular

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	☐ Tampón fosfato (PBS 1x)
☐ Azul de tripano	☐ Rascadores de placas
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Tubos de 15 ml (estériles)	☐ Agentes tóxicos (CuSO ₄ y ZnSO ₄)
☐ Pipetas de 10 ml (estériles)	☐ Cámara de Neubauer
☐ Medio de Reacción	☐ Tubos de microcentrífuga
☐ Pipetas estériles pasteur	

MÓDULO IV-A

PREPARACIÓN DEL BANCO DE DILUCIONES DEL AGENTE TÓXICO CON EL QUE VAMOS A INCUBAR LAS CÉLULAS

Cada uno de los 4 grupos utilizará UN ÚNICO agente tóxico para su estudio, a las concentraciones señaladas en cada una de las series de diluciones correspondientes a ese agente -**dos grupos** utilizarán CuSO₄ y otros **dos grupos** utilizarán ZnSO₄-.

1. **MARCAR** cada uno de los 4 tubos estériles de 15 ml de la siguiente manera: rotular 1 tubo como *control* y los restantes como CuSO₄ o bien como ZnSO₄, según el agente tóxico de estudio.

2. **IDENTIFICAR** cada uno de los tres tubos correspondientes a CuSO_4 como 0,5 mM – 2 mM y 4 mM. Hacer lo mismo con los tres tubos correspondientes al ZnSO_4 e *identificarlos* como 0,5 mM – 1,5 mM y 3 mM.

3. **GENERAR, cada uno de los 4 grupos de prácticas,** el banco de diluciones que vamos a utilizar, *teniendo en cuenta que se debe agitar los tubos* para homogeneizar el contenido, **antes de coger un volumen y realizar la siguiente dilución:**

Diluciones de CuSO_4 :

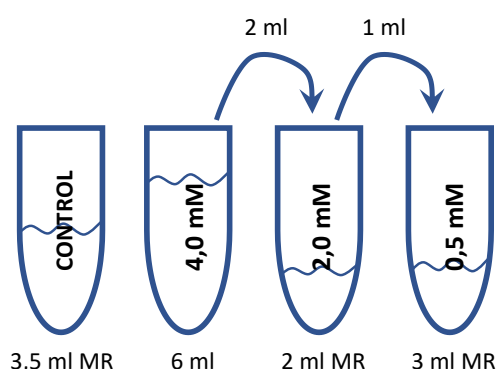
Control: Añadir 3 ml de Medio de Reacción (MR)
4 mM: Agitar la solución de CuSO_4
2 mM: Añadir 2 ml de MR + 2 ml de solución 4 mM
0,5 mM Añadir 3 ml de MR + 1 ml de solución 2mM

Diluciones de ZnSO_4 :

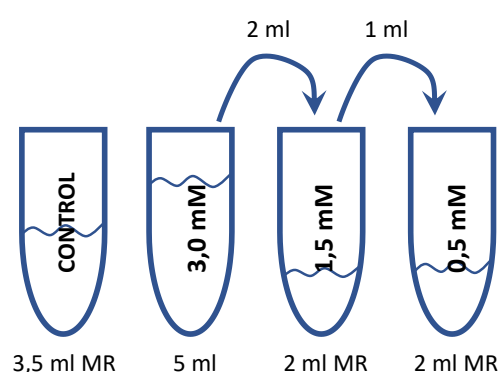
Control: Añadir 3 ml de Medio de Reacción (MR)
3 mM: Agitar la solución de ZnSO_4
1,5 mM: Añadir 2 ml de MR + 2 ml de solución 3 mM
0,5 mM Añadir 2 ml de MR + 1 ml de solución 1,5 mM

De forma esquemática, el procedimiento a seguir en el caso de la preparación del banco de diluciones de CuSO_4 y del ZnSO_4 , es el siguiente:

Diluciones de CuSO_4 :



Diluciones de ZnSO_4 :



INCUBACIÓN CELULAR CON EL AGENTE TÓXICO

La incubación de las células con la serie de diluciones del agente tóxico, se debe realizar cuando la densidad del cultivo celular alcanza al 80-85% de confluencia.

Debemos **ASEGURARNOS** de tener las placas de cultivo bien identificadas con el agente tóxico que se va a utilizar, la concentración utilizada y el triplicado correspondiente. Se puede escribir los datos en la tapa de cada placa, según el esquema mostrado anteriormente. Ejemplo de identificación de una placa:

CONTROL	0,5 mM	1,5 mM	3,0 mM
	ZnSO ₄		

RECORDAR que cada tubo de la serie de diluciones, contiene el volumen suficiente para realizar la incubación del tóxico en tres pocillos de células (triplicado de una misma concentración del agente tóxico).

1. **ASPIRAR** el medio contenido en un pocillo con ayuda de una pipeta pasteur estéril **con mucho cuidado para no llevarse las células adheridas a la placa**, y **AÑADIR** con suavidad 1 ml de la concentración del agente tóxico contenido en el tubo. **REPETIR** este procedimiento con los pocillos que forman parte del triplicado.
2. **REPETIR** el punto 1 para cada una de las concentraciones del agente tóxico y también para el control.
3. **INCUBAR** las placas de cultivo a 27°C durante 24 horas.

MÓDULO IV-B

DISCRIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS VIABLES RESPECTO DE LAS NO VIABLES

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

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

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

Protocolo de viabilidad celular mediante el colorante azul de tripano:

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

Antes de empezar la práctica, debemos rotular los 12 microtubos eppendorf para identificar las células que depositaremos en ellos. Por ejemplo Control1, Control2, Control3 -Cu0,5 1, Cu0,5 2, Cu0,5 3.....

1. **RECUPERAR** la placa de 12 pocillos, después de 24 horas de haber incubado el cultivo con el agente tóxico, y observar las células al microscopio. **ANOTAR** el resultado de la observación en el cuaderno de prácticas y compararlas con las células del triplicado CONTROL. **IDENTIFICAR** las diferencias, si las hubiere.

2. Con ayuda del rascador, **RASCAR** suavemente cada uno de los pocillos de la placa del cultivo celular asegurándonos que llegamos con el rascador a toda la superficie donde se encuentran las células adheridas. NOTA: Se aconseja realizar esta tarea cada 3 pocillos (por grupos de tratamiento), limpiando el rascador después de cada triplicado.

3. **PIPETEAR** suavemente las células arriba y abajo tres veces con ayuda de una pipeta pasteur y así dispersar las células del cultivo.

4. **AÑADIR** el homogenado celular a cada uno de los microtubos correspondientes.

5. **CENTRIFUGAR** los microtubos a 1000 rpm durante 5 minutos.

6. **ASPIRAR** el sobrenadante (medio de cultivo) con ayuda de una pipeta de volumen variable y **EVITAR** que se aspiren las células presentes.

7. **AÑADIR** 500 µl de tampón fosfato (PBS 1x) a cada uno de los dos tubos de microcentrífuga con ayuda de la pipeta de volumen ajustable y, **suavemente**, resuspender las células, **evitando** la formación de espuma.

8. **TRANSFERIR** 10 µl de colorante azul de tripano a un tubo de microcentrífuga. **AÑADIR** 10 µl de la suspensión celular y, con cuidado, pipetear el volumen arriba y abajo repetidas veces para que la suspensión celular sea homogénea. Ahora tenemos el doble de volumen → Factor de dilución = 2.

9. **INCUBAR** las células del tubo durante 1 minuto a temperatura ambiente.

10. **TRANSFERIR** lentamente 10 - 12 µl (aproximadamente una gota) de la suspensión de células teñidas de azul de tripano a una muesca situada en el centro de una cámara de recuento de las diez que contiene cada portaobjetos de recuento de células. La cámara se llenará por acción capilar.

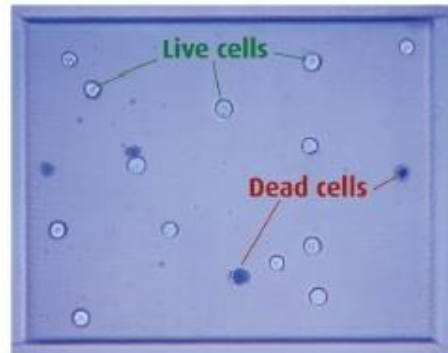
11. **EXAMINAR** la cámara de recuento en el microscopio usando el objetivo de menor aumento.

12. **ENFOCAR** las líneas de la rejilla en la cámara. Mover el portaobjetos hasta que el campo que se vea sea la rejilla externa. Utilizar un objetivo de

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

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

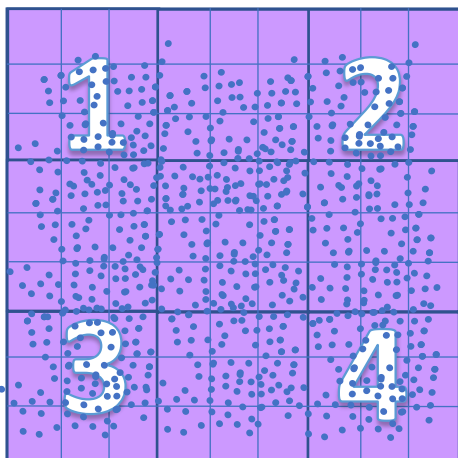
Figure 10: Trypan blue staining of cells



NOTA: Este paso se puede realizar directamente en la observación al microscopio o bien sobre una fotografía de la observación, en caso de que el microscopio esté dotado de una cámara fotográfica.

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

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



NOTA: Una de las opciones para obtener **el nº medio de células** es contar las células presentes en cada una de las cuatro zonas de 9 cuadrados de las esquinas. Una vez obtenido el nº de células, se suman y el resultado se divide por cuatro.

$$\text{número medio} = \frac{n1 + n2 + n3 + n4}{4}$$

CÁLCULO DEL NÚMERO DE CÉLULAS VIABLES Y NO VIABLES

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

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

$$\text{nº medio de células viables (o no viables) / ml} =$$

nº medio de células viables (o no viables) contadas x factor de multiplicación
x factor de dilución.

Factor de multiplicación = 4500.

Factor de dilución = 2 (en este caso, hemos diluido las células en un volumen doble del inicial, 10 µL azul tripano + 10 µL, antes de depositarlas en la cámara de conteo).

Por ejemplo: Se diluyen 10 µl de células en 10 µl de colorante azul de tripano y el número medio de células es de 75

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

Para **calcular** nº células viables/ml = $75 \times 4500 \times 2 = 0,65 \times 10^6$ células/ml

Nota: Este cálculo también debe de realizarse con las células no viables que hemos contado.

CÁLCULO DE LA VIABILIDAD CELULAR. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES

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

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

Viabilidad = $\frac{\text{Número de células viables}}{\text{nº total de células (viables + NO viables)}} \times 100$

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

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

NOTA:

Una vez finalizado el recuento de células del triplicado de un grupo, **iniciar** el protocolo raspando otro triplicado y **realizar** el mismo procedimiento para el triplicado del siguiente grupo de condiciones experimentales a las que hemos expuesto las células con el agente tóxico.

Ordenar los resultados obtenidos en una tabla y representarlos en una gráfica.

Anotar en la libreta de prácticas la discusión de los resultados, indicando asimismo la concentración que causa el 50 % de mortalidad celular, la que causa el 100% de muerte celular, la concentración mínima a la que el agente tóxico empieza a producir la muerte celular.

Comparar los resultados entre los diferentes agentes tóxicos utilizados.

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. ¿Por qué se utiliza un banco de diluciones de un supuesto agente tóxico en las incubaciones de cultivos celulares?
4. ¿La toxicidad producida por un agente tóxico en un cultivo de células determinado (p.e. células de insecto) es extrapolable a otro cultivo de células diferente (p.e. células de fibroblastos de ratón)? Razonar la respuesta
5. ¿Es interesante conocer el valor de la LD50 de un determinado tóxico? ¿Por qué?
6. ¿Por qué se ha cambiado el medio celular presente en el triplicado control por medio de reacción? Razonar la respuesta

ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PRÁCTICA Y ANÁLISIS

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

Las diferencias obtenidas en las curvas de toxicidad, son sensibles a las variaciones de las concentraciones utilizadas debido a errores en el pipeteo y al nivel de confluencia del cultivo celular cuando se incuba con el agente tóxico.

Las pequeñas diferencias obtenidas en el banco de diluciones de los tóxicos, debidas a errores en el pipeteo, pueden traducirse en la observación experimental como una mayor o menor toxicidad producida. **Debemos de tener en cuenta** que la mortalidad celular es sensible a pequeños cambios en la concentración de agentes tóxicos.

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 las células contenidas en los tubos en los frascos de cultivo de 25 cm² con tapa verde, un vial por tubo. El contenido celular de dos frascos al 85% de confluencia es suficiente para que realicen la práctica los cuatro grupos de alumnos (4 placas de 12 pocillos).

b) Antes del inicio de las prácticas

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

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

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

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

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

c) Durante las prácticas

Recordar que los alumnos deben observar el estado de las células, antes y después de la incubación con el agente tóxico.

Organización e implementación previas de la práctica

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

Esterilización de equipos y materiales

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

2. Todos los materiales, tanto sólidos como líquidos, que entran en contacto con las células y se han de desechar, deben ser 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 cuatro módulos y debe durar aproximadamente de una a dos semanas. Las siguientes Tablas son una guía para la implementación de esta práctica, que pueden ser adaptadas a las circunstancias específicas de cada clase.

Módulo	Preparaciones previas	Parte práctica
<u>I</u>	15 min	15-30 min
<u>II</u>	10-15 min	30-45 min
<u>III</u>	15 min	45-60 min
<u>IV</u>	30 min	1. Incubación tóxicos: 45 min 2.Viabilidad celular: 70-90 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: Diseño experimental de la toxicidad en células de insecto causada por agentes ambientales	Suministrar información	Al inicio de la práctica	5 min
Módulo III: Manipulación de un cultivo de células. Resiembra	Preparar y distribuir los materiales	Una hora antes de realizar la práctica	15-20 min
Módulo IV: Estudio de la exposición de toxinas en los cultivos de células de insecto. Viabilidad celular	Alicuotar el azul de tripano, realizar el banco de diluciones y distribuir los materiales	Antes de realizar la práctica	20-30 min

Recomendamos preparar el equipo y los reactivos para los [Módulos I, III y IV](#) 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.

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 insectos prefieren crecer en la oscuridad, por lo que los envases transparentes deben estar cubiertos con papel de aluminio.

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

b) Preparación de alícuotas del medio de cultivo de células (Módulo III) y del medio de reacción (Módulo IV).

Medio de cultivo de las células

1. **ALICUOTAR** asépticamente **15 ml** de **Medio de cultivo para células** en cuatro tubos de 15 ml, previamente identificados según el grupo de alumnos. Reserve el medio restante para iniciar el cultivo de células de insectos.
2. **ALICUOTAR** asépticamente **14 ml** de **Medio de reacción** en cuatro tubos de 15 ml, previamente identificados según el grupo de alumnos.
3. **ALICUOTAR** 7 ml de tampón fosfato en 4 tubos de 15 ml.
4. **ETIQUETAR** cada tubo como **Medio de cultivo de las células de insecto, Medio de reacción o bien como tampón fosfato**, según corresponda.
5. **ALMACENAR** a 4 ° C hasta que los estudiantes lo necesiten en el [Módulo III y Módulo IV](#).

c) Inicio del cultivo de las células recibidas

Las células de insecto Sf9 se envían en un vial y se deben transferir a los frascos de cultivo de 25 cm², tan pronto como se reciban.

1. **ATEMPERAR** el medio de cultivo de células de insecto a temperatura ambiente.
2. **AÑADIR 1 ml** de medio de cultivo de células de insecto a cada frasco de cultivo, 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** todo el volumen de células de insecto Sf9 al frasco (estéril) de cultivo celular.

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

5. **INCUBAR** 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: DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA TOXICIDAD EN CÉLULAS DE INSECTO CAUSADA POR AGENTES AMBIENTALES

1. **LEER** el protocolo en el apartado del Módulo II.

2. **DISEÑAR** un experimento alternativo.

Cada grupo necesita:

☐ Bata de laboratorio

PREPARACIÓN MÓDULO III: MANIPULACIÓN DE UN CULTIVO DE CÉLULAS. RESIEMBRA

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

Cada grupo necesita:

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Pipetas de volumen variable
☐ Medio de cultivo	☐ Rascadores de placas
☐ Pipetas de 10 ml (estériles)	☐ Cámara de Neubauer
☐ Pipetas estériles pasteur	☐ Puntas estériles de pipetas
☐ Placa de 12 pocillos	

PREPARACIÓN MÓDULO IV: ESTUDIO DE LA EXPOSICIÓN DE TOXINAS EN LOS CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO. VIABILIDAD CELULAR

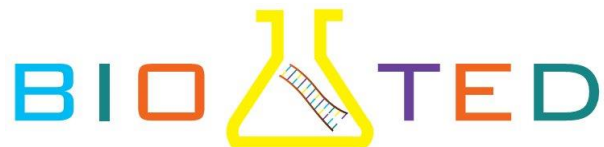
1. ALICUOTAR en tubos de microcentrífuga 250 µl de **azul de tripano (D)** para los cuatro grupos.

1. REALIZAR el banco de diluciones con el agente tóxico.

NOTA: La cámara de recuento y la alícuota de azul de tripano que recibirá cada grupo deben guardarse para su uso en ensayos de recuento posteriores.

Cada grupo necesita:

☐ Guantes	☐ Máscara facial
☐ Bata de laboratorio	☐ Etanol al 70%
☐ Vaso de precipitados para la eliminación de residuos	☐ Tampón fosfato (PBS 1x)
☐ Medio de Reacción	☐ Rascadores de placas
☐ Pipetas de volumen variable	☐ Puntas de pipeta (estériles)
☐ Tubos de 15 ml (estériles)	☐ Agentes tóxicos (CuSO ₄ y ZnSO ₄)
☐ Pipetas de 10 ml (estériles)	☐ Cámara de Neubauer
☐ Azul de tripano	☐ Tubos de microcentrífuga
☐ Pipetas estériles pasteur	



Registro de datos de viabilidad celular

GRUPO
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES
FECHA

RESULTADOS DE VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO SF9

AGENTE TÓXICO: ZnSO₄

	CONTROL			ZnSO ₄ (0,5 mM)			ZnSO ₄ (1,5 mM)			ZnSO ₄ (3 mM)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
N° CÉLULAS VIABLES												
N° CÉLULAS NO VIABLES												
N° CÉLULAS TOTALES												

	VALOR MEDIO							
	CONTROL		ZnSO ₄ 0,5 Mm		ZnSO ₄ 1,5 Mm		ZnSO ₄ 3 Mm	
	Valor	±DS	Valor	±DS	Valor	±DS	Valor	±DS
N° CÉLULAS VIABLES								
N° CÉLULAS NO VIABLES								
N° CÉLULAS TOTALES								

DS → Desviación Estandar

	% DE VIABILIDAD CELULAR			
	CONTROL	ZnSO ₄ 0,5 Mm	ZnSO ₄ 1,5 Mm	ZnSO ₄ 3 Mm
VALOR MEDIO				
DESVIACIÓN ESTANDAR				

LD50:

GRUPO
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES
FECHA

RESULTADOS DE VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO SF9

AGENTE TÓXICO: CuSO ₄	CONTROL			CuSO ₄ (0,5 mM)			CuSO ₄ (2 mM)			CuSO ₄ (4 mM)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
N° CÉLULAS VIABLES												
N° CÉLULAS NO VIABLES												
N° CÉLULAS TOTALES												

	VALOR MEDIO							
	CONTROL		CuSO ₄ 0,5 Mm		CuSO ₄ 2 Mm		CuSO ₄ 4 Mm	
	Valor	±DS	Valor	±DS	Valor	±DS	Valor	±DS
N° CÉLULAS VIABLES								
N° CÉLULAS NO VIABLES								
N° CÉLULAS TOTALES								

DS → Desviación Estandar

	% DE VIABILIDAD CELULAR			
	CONTROL	CuSO ₄ 0,5 Mm	CuSO ₄ 2 Mm	CuSO ₄ 4 Mm
VALOR MEDIO				
DESVIACIÓN ESTANDAR				

LD50:

