

## DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE DETECCIÓN DE ADN

#### 1. OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS

El objetivo de estas prácticas es ofrecer a los estudiantes una herramienta experimental alternativa en la identificación del proceso de muerte celular por apoptosis.

#### 2. MATERIAL Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Componentes	Envío	Conservación
Células de insecto (Sf9).	4 viales	T.A.
Medio de cultivo de las células de insecto	80ml	4 °C
Medio de reacción	60ml	4 °C
Tampón de lisis	12 ml	T.A.
Frasco cultivo celular (estériles, 75 cm²)	2 unid	
Tubos de 50 ml (estériles)	2unid	
Solución de etanol en medio de reacción	9 ml	4 °C
Solución de actinomicina (medio de reacción)	2 ml	4 °C
Placas de cultivo celular de 60 mm (estériles)	18 unid	
Pipetas de 10 ml (estériles)	11 unid	
Pipetas pasteur (estériles)	42 unid	
Rascadores (estériles)	8 unid	
Cámaras de recuento celular	1 unid	
Tubos de fondo cónico de 15 ml (estériles)	26 unid	
Tampón Precipitación de proteína	8 ml	T.A.
Tampón de Hidratación	2 ml	T.A.
RNAsa	80 µl	4 °C
Tubos de fondo cónico de 10 ml (estériles)	18 unid	
Tubo de centrifuga de 1,5 ml	18 unid	

Esta práctica está diseñada para 6 grupos de estudiantes y contiene los reactivos y materiales suficientes para desarrollarla con éxito.

**NOTA:** Las células de insecto Sf9 se deben solicitarcon un mínimo de 2 semanas de antelación de la fecha prevista del iniciodelasprácticas. Las células de insecto se deben**cultivar inmediatamente** después de su recepción (ver protocolo anexo 3).

<u>NOTA:</u>El Medio de Cultivo de las células de insecto (MC) y elMedio de Reacción (MR) 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).
- Baño, centrífugas y cubetas de electroforesis.
- Agarosa
- 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).
- 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 contaje de las células en la cámara de recuento celular, utilizar el microscopio de estudiante (posición vertical).

#### 3. INTRODUCCIÓN

#### El cultivo de células eucarióticas

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

Aunque los científicos realizaron los primeros experimentos de cultivo celular a mediados de 1800, las técnicas no se desarrollaron realmente hasta el siglo XX. Desde entonces, el cultivo celular ha permitido que células

de docenas de especies sean cultivadas y estudiadas. Uno de los primeros de estos experimentos implicó 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 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 las adiciones o supresión de genes o detectar terapias eficaces.

#### El cultivo de células de insectos Sf9



El cultivo de células de insectos se originó como un enfoque para comprender mejor la biología de los insectos. Muchos de los primeros estudios con células de insectos fueron diseñados para analizar cuestiones biológicas básicas. Estos proporcionaron experimentos 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, Spodopterafrugiperda (palomilla del maíz) (Figura 1).

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

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



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

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

#### Técnicas de cultivo celular

Se han desarrollado muchas herramientas y técnicas para mantener células cultivadas. Por ejemplo, los investigadores utilizan frascos estériles y placas

que han sido tratadas para permitir que las células se adhieran y crezcan. La mayoría de las líneas celulares no humanas no son patógenas y se pueden manipular en campanas de cultivo estándar. Estas campanas ayudan a prevenir la contaminación de las células por bacterias, hongos, levaduras y moho, pero no están diseñadas para proteger al científico (Figura 3). Por el contrario, las células



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

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

#### **Apoptosis**

El término apoptosis fue acuñado en 1972 por Kerr, Wyllieand Currie para describir un mecanismo de muerte celular programada en el que las células se autodestruyen sin que se activen los procesos de inflamación como respuesta a la muerte celular.

La apoptosis se considera como un proceso de muerte natural fisiológica, que interviene en las etapas de eliminación de células no deseadas. Durante el desarrollo embrionario se produce un exceso de células, cuyo número se va reduciendo en las diferentes etapas de formación y maduración del embrión. La disminución de este número de células se produce mediante la activación de un mecanismo de señalización celular.

La muerte por apoptosis se evidencia en procesos fisiológicos como la remodelación de los huesos y cartílagos, durante la morfogénesis de los dedos en la eliminación de las áreas interdigitales, durante la eliminación del exceso de neuronas que se observa durante el desarrollo del sistema nervioso, durante la organogénesis -p.e., en la formación de riñones-...

La apoptosis se caracteriza porun conjunto ordenado de cambios que se inician con una condensación de la cromatina nuclear seguida de la fragmentación nuclear, aparición de protusiones citoplasmáticas en la superficie celular y, finalmente, desintegración celular, generando múltiples cuerposapoptóticos envueltos de membrana citoplasmática. Estos cuerposapoptóticos serán fagocitados por células especializadas (macrófagos) o, en algunos casos, por las células vecinas.

Uno de los elementosbioquímicos centrales en el proceso apoptótico es la degradación inicialdel ADN en fragmentos grandes de 50 a 300 kilopares de

bases que, con posterioridad, dan lugar a la aparición de los fragmentos internucleosomales, en los que interviene una endonucleasa, originando fragmentos de 200 pares de bases.

La separación de estos fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa, revela el patrón característico de la apoptosis observando que el ADN aparece en el gel en forma de un degradado en escalera. Este patrón, contrasta con el observado en la muerte apoptótica, ya que el ADN aparece en el gel como una mancha difusa, debido a la degradación completa del ADN sin apreciar los fragmentos internucleosomales típicos de la apoptosis.

De igual forma, existen diferentes aproximaciones experimentales que se utilizan para poner de manifiesto la muerte apoptótica, entre las que se encuentran:

El uso de fluorocromos que se intercalan en el ADN y permiten visualizar la morfología de la cromatina. Los más utilizados son el bromuro de etidio o bien el Hoechst, que permiten cuantificar las células apoptóticas en un cultivo.

La tinción TUNEL, basada en la capacidad que presentan los extremos de ADN, hidrolizados por la endonucleasa, a unirse a una cadena de dioxigeninadUTP y posterior aplicación de técnicas inmunológicas, permitiendo su identificación.

El marcaje de fosfatidilserina, en el lado extracelular de la membrana citoplasmática, mediante la proteína anexina V.

En el presente kit de detección de apoptosis, se obtendrá el ADN de células tratadas con un agente apoptótico para ser detectado en la electroforesis de gel de agarosa.

#### 4. PRÁCTICAS A REALIZAR CON EL PRESENTE KIT:

Las prácticas se dividirán en 3 módulos:

• <u>Módulo I:</u> 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: Inducción de la apoptosis en células Sf9

En este módulo, los estudiantes aprenderán a manejar un cultivo celular, hacer la resiembray llevarlo a las condiciones óptimas para estimularlo con un agente apoptótico.

• <u>Módulo III:</u> Obtención del homogenado celular. Extracción y detección de ADN

En este apartado, los estudiantes manipularán los cultivos de células de insectoy obtendrán los homogenados de las células apoptóticas en el que estará el ADN. Los alumnos aprenderán a realizar la extracción de DNA y su visualización mediante la electroforesis en geles de agarosa.

### **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. Utilizarbatas 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

Debemos de tener en cuenta, antes de empezar a manipular el cultivo, la siguiente metodología:

- 1. **ESTERILIZAR** todas las superficies de la poyata de trabajo con etanol al 70% utilizando una toalla de papel limpia.
- 2. **DI SPONER PREVI AMENTE** 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 de su rango de visión y asegurarse que la pipeta siempre esté en contacto con la vista y no oculta trasuno 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 de permanecer inclinada, reduciendo la contaminación (Figura 6).
- 3. **EVITAR** el vertido desde un contenedor estéril a otro a menos que la botella de la que vaya a verter se use sólo una vez y vacíe todo su contenido en la transferencia. El procedimiento del vertido, provoca la forma

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 el dióxido de carbono y el contenido de oxígeno de la atmósfera interior.

La ventaja de trabajar con células de insecto Sf9 es que pueden crecer a temperatura ambiente y no requieren un entorno de crecimiento complicado. 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.



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

# MÓDULO I: Observación y evaluación del estado del cultivo celular

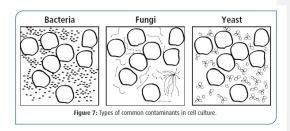
#### **GENERALIDADES**

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

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

• <u>Bacterias</u>: 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.



- <u>Hongos</u>: 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.
- <u>Levadura</u>: 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.

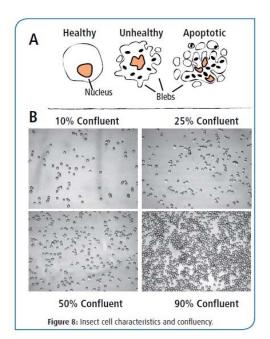
**ES MUY IMPORTANTE** examinar las células de insectos antes de cada experimento de cultivo celular para asegurar que estén sanas y libres de contaminación (condiciones óptimas). Las células insalubres y apoptóticas mostrarán un aumento de las partículas pequeñas (denominadas gránulos), la formación de vacuolas, la contracción celular, la aparición del fenómeno de <u>blebbing</u> 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.

<u>Recordar</u> 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 presenteen el medio y este necesita ser cambiado o bien que las células han llegado a una confluencia superior al 80% y deben ser subcultivadas.

<u>NOTA:</u> Si el cultivo de células está contaminado, añadir inmediatamente 1 ml de solución de lejía al 10% al frasco. 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.

<u>NOTA:</u> 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 mástiempo para crecer y necesitan ser alimentadas o bien si están al 80%-90% de confluencia y necesitan ser amplificadas.
- 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: Inducción de la apoptosis en células Sf9

#### MATERIAL NECESARIO PARA MÓDULO II-1

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 completo	Rascadores de placas
Pipetas de volumen variable	Puntas de pipeta (estériles)
Cámara de Neubauer	☐Tubos de 15 ml (estériles)
Placas de cultivo de 60 mm	☐Pipetas de 10 ml (estériles)
☐Tubos de 50 ml (estériles)	

#### MÓDULO II-1

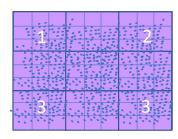
Una vez observamos el cultivo celular y vemos que no hay contaminación celular, cogemos cada uno de los dos frascos de células (75 cm2, tapón verde) y procedemos a resembrarlas en placas de 60 mm.

<u>Recordar</u> que el contenido de cada frasco de cultivo contiene las células suficientes para tres grupos de prácticas y cada grupo de prácticas tendrá 3 placas de 60 mm para realizar el subcultivo celular y proceder a la práctica.

#### Protocolo:

- 1. **Levantar** las células adheridas a cada uno de los frascos 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  $\mu$ I, 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:



$$n^{o}$$
 medio de células = 
$$= \frac{n^{o} de células totales en las 4 zonas}{4 zonas}$$

 $n^{o}$  células / $ml = n^{o}$  medio de células x x factor de dilución x factor multiplicación

#### Ejemplo:

Nº medio de células = 275

Factor de dilución = 1

Factor multiplicación = 4500

275 x 1 x 4500 ~(1,23 Millones de células)/ml

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

#### Cada tubo de células se utilizará para tres grupos de prácticas:

Entre los tres grupos tenemos 9 placas de 60 mm, por lo que **necesitamos**:

- 1,2 millones de células x 9 placas = 10,8 millones de células.
- 3 ml de medio de cultivo x 9 placas = **27 ml de medio de cultivo totales**.

En la preparación del homogenado celular utilizaremos dos tubos de 50 ml. Cada uno contendrá un volumen final de homogenado de <u>27 mililitros de medio de cultivo con un total de 10,8 millones de células, necesario para 3 grupos de prácticas.</u>

**IMPORTANTE:**En nuestro ejemplo, si **en un tubo**tenemos una concentración de 1,23 M células / ml y necesitamos un total de 10,8 millones de células (**necesariospara tres grupos**), debemos tomar, aproximadamente,8,8 ml del homogenado celular.

Con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml, pondremos 8,8 ml del homogenado celular en un tubo de 50 ml y añadiremos 18,2 ml de medio de cultivo para obtener los 27 ml de homogenado celular con ayuda de otra pipeta estéril de 10 ml, necesarios para las 9 placas correspondientes a los 3 grupos de prácticas.

Repetirel procedimiento con el otro frasco de cultivo de células.

Volumen de medio a a $\tilde{n}$ adir = 27 ml (Vtotal) - 8,8 ml (Vhomogenado)

#### <u>Volumen de medio a añadir = 18,8 ml de medio completo</u>

Una vez tengamos los 27 ml que incluyen 10,8 M de células, homogenamossuavemente con ayuda de una pipeta estéril de 10 ml y depositamos 9 ml en un tubo de 15 ml para cada grupo de alumnos. Añadimos con una pipeta estéril pasteur 3 ml en cada una de las tres placas que tiene cada grupo y agitamos suavemente para distribuir las células en cada placa y las depositamos en el incubador.

**TENER EN CUENTA**que, para utilizar los datos del ejemplo, ES NECESARIO ajustar la concentración inicial de células a 1,23 M / ml.

- 7. **Distribuir** el homogenado celular, 9 ml en cada uno de los tubos de 15 ml.
- 8. **Sembrar**las placas de cultivo de 60 mm,bajo la campana, añadiendo 3 ml del homogenado celular en cada una de las placas, con ayuda de una pipeta pasteur estéril. <u>La densidad celular es de 1,2 millones de células/placa</u>.
- 9. **Incubar** las células a 27°C hasta conseguir una confluencia del 75-80%.
- 9. Continuar con el módulo II-2.

#### MATERIAL NECESARIO PARA MÓDULO 11-2

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 Reacción	Solución de etanol
Pipetas de volumen variable	Puntas de pipeta (estériles)
Solución de Actinomicina	☐Tubos de 15 ml (estériles)
☐Pipetas de 10 ml (estériles)	☐Tubos de 10 ml (estériles)

#### MÓDULO II-2

Recordad que se debe de trabajar en condiciones estériles para no contaminar los cultivos por lo que, en lo posible, hay que trabajar bajo la campana de flujo laminar ytener cuidado en mantener estéril todo el material que introduzcamos en ella.

El planteamiento del experimento exige que tengamos unos controles con los que comparar los efectos apoptóticos del agente objeto de estudio.

Para analizar el efecto del agente apoptótico, debemos plantearnos tres posibilidades en nuestros resultados:

1) que el agente a estudiar <u>no tenga ningún efecto sobre nuestro cultivo</u>. Entonces el resultado obtenido en el gel de agarosa deberá ser similar al obtenido en el cultivo que no ha sido incubado con el agente apoptótico.

2) que el efecto de <u>muerte</u> <u>celular sea de tipo necrótico</u> y no de tipo apoptótico. Entonces el resultado obtenido en el gel de agarosa deberá de ser similar al obtenido en el cultivo que ha sido incubado con el agente necrótico.

MW C C N A

Comentario [DN1]:

3)que el efecto producido por el agente a estudiar sea <u>de tipo apoptótico</u> y el resultado obtenido en el gel de agarosa sea diferente a los dos anteriores y corresponda al patrón típico de bandas de ADN tipo escalera (ver figura).

Para identificar los resultados que se obtengan de la incubación del agente objeto de estudio, deberemos tener:

- a) un cultivo de células que se haya incubado con el medio de reacción en el que NO se hayanincluido el agente necrótico ni el agente apoptótico.
- b) un cultivo de células que se haya incubado con un agente conocido que provoque la muerte celular necrótica.
- c) un cultivo de células que se haya incubado con el agente apoptóticoobjeto de estudio.

#### Protocolo:

Antes de proceder a la incubación, cada grupo deberá tener 3 tubos de 5 ml en la gradilla e identificarlos de la siguiente manera:

- a) Tubo control.
- b) Tubo necrosis
- c) Tubo actinomicina -a determinar su efecto apoptótico-
- 1. **Añadir** 3 ml de medio de reacción en el tubo estérilde 5 ml marcado como control.
- 2. **Añadir**1,5 ml de medio de reacción al tubo estéril de 5 ml marcado como necrosis.
- 3. **Añadir**1,5 ml de la solución de etanol recibida al tubo marcado como necrosis -para alcanzar el volumen final de 3 ml-.
- 4. **Agitar**el tubo con la solución de *actinomicina*recibida (para que se homogeneice) a un tubo estéril de 5 ml y **añadir**300  $\mu$ l al tubo que hemos marcado como actinomicina. **Añadir** 2,7 ml de medio de reacción a este tubo.
- 5. Homogeneizarel medio de cada uno de los tuboscon la pipeta pasteur.
- 6. Marcar cada una de las 3 placas como control, necrosis, y actinomicina.
- 7. **Aspirar** con ayuda de una pipeta pasteur el medio contenido en la placa control, con mucho cuidado de no arrastrar las células adheridas a la placa.
- 8. **Añadir**nuevamente a la placa control, con ayuda de una pipeta pasteur,3 mldel tubo marcado como *control*.
- 9. **Repetir** el mismo procedimiento con cada una de las placas restantes.
- 10. **Incubar** las placas de células a 27°C durante 24 horas.

### Módulo III: Obtención del homogenado celular. Extracción y detección del ADN

#### **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 de lisis	Rascadores de placas
Pipetas de volumen variable	Puntas de pipeta (estériles)
☐Tubos de 15 ml (estériles)	Reactivos extracción ADN

Antes de proceder a obtener el homogenado celular, 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. **Identificar**tres tubos de 15 ml, según hemos identificado las tres placas de cultivo.
- 2. **Levantar** suavemente las células adheridas a la placa con ayuda de un rascador.
- 3. **Aspirar** el homogenado con ayuda de una pipeta pasteur y depositarlo en el tubo correspondiente que acabamos de identificar.
- 4. Centrifugar los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos.
- 5. **Marcar**tres microtubos tal y como hemos identificado las placas de cultivo.
- 6. Después de centrifugar los tubos de 15 ml, **aspirar** el medio con mucho cuidado de no llevarse las células.

7. **Añadir** $600~\mu$ l de tampón de lisis a cada uno de los tubos, resuspender las células con ayuda de la micropipeta subiendo y bajando el volumen. **Vigilar** que no queden grumos de células y depositarlas en cada uno de los microtubos marcados.

**NOTA:** Proceder a la extracción del ADN (se administran los reactivos) y **analizar** el ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa (en caso necesario, equipamiento electroforesis disponible en Danagen).

- 8. **Incubar** a 55°C durante 15 minutos y observar la solución homogénea. Tratamiento de RNasa.
- 9. Añadir2 µl de RNasa al lisado.
- 9. **Mezclar** la muestra por inversión del tubo e incubar a 37°C durante 15-60 minutos.
- 10. Añadir 360 µl de Solución de precipitación de proteínas.
- 11. **Agitar**vigorosamente con Vortex durante 20-30 segundos.
- 12. **Centrifugar** a 14.000 x g durante 5 minutos. Se observará que elprecipitado proteico forma un pellet.
- 13. **Pasar** el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga 600 µl deisopropanol. Mezclar por inversiónvarias veces.
- 14. Centrifugar a 14.000 x g durante 3 minutos.
- 15. **Eliminar** el sobrenadante. **Añadir** 600  $\mu$ l de etanol 70% e invertir varias veces paralavar el pellet de ADN.
- 16. **Centrifugar** a 14.000 x g durante 2 minutos. Cuidadosamente eliminar todo eletanol. Vigilar no perder el pellet de ADN.
- 17. **Invertir** el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos.
- 18. **Añadir** 100 µl de Solu**c**ín de Hidratación del ADN. *NOTA:*Si el pellet obtenido es muy grande, aumentar la Solución de Hidratación.
- 19. **Incubar** a 65°C durante 1 hora con periódicas agitaciones para ayudar a la dispersión delADN, o incubar "overnight" a temperatura ambiente o 4°C con agitación para que se rehidrate.
- 20. **Conservar** a 2-8°C. Para almacenajes largos conservara –20°C o 80°C.
- 21. **Visualizar** el ADN en un gel de agarosa al 3% (contiene el intercalador de ADN)

#### **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. Si queremos determinar el efecto apoptótico de una molécula determinada, ¿por qué se utilizancultivos celulares incubados en diferentes condiciones experimentales?
- 4. ¿Deberíamos aplicar otra técnica para confirmar el efecto apoptótico observado en la fragmentación del ADN?
- 5. Razonar el mecanismo por el que la actinomicina produce la muerte celular por apoptosis -buscar información adicional-.
- 6. Indicar algún método alternativo para detectar la muerte celular por apoptosis.

#### **ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PRÁCTICA Y ANÁLISIS**

La intensidad de las bandas de ADN obtenidas de las células a las que se les ha inducido la apoptosis, dependerá de la homogeneidad en la concentración de ADN obtenida en las diferentes estimulaciones. Es importantes eguir las instrucciones del kit de extracción de ADN para que en la hidratación del ADN en la última etapa de la extracción tengamos el ADN concentrado.

Los carriles de ADN observados en el gel de agarosa en las muestras de ADN obtenidas de células apoptóticas, puede ser similar al del carril de las muestras control. En este caso, asegurarse de que haber añadido la enzima RNAsa en el proceso de extracción y la concentración de ADN de las muestras sean comparables.

El efecto escalera del ADN fragmentado es difuso y no se puede determinar con claridad el tamaño de los fragmentos. Para asegurarnos de su tamaño, debemos habilitar un pocillo en el gel de agarosa en el que se ha de añadir el marcador de peso molecular correspondiente. El ADN obtenido pudiera estar demasiado diluido.

# 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.

 $\underline{Cultivar}$  cada dostubos que contienenlas células en un frasco de cultivo de 75 cm $^2$  (con tapa verde).

El contenido celular de un frasco al 80-90% de confluencia, es suficiente para que realicen la práctica tres grupos de alumnos (9 placas de 60 mm).

#### 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 <u>los rascadores de células estériles deben de lavarse y</u> <u>guardarse para sucesivos usos</u> que no requieran de esterilidad ya que el cultivo no se mantiene y se desecha.

#### c) Durante las prácticas

Recordar que los alumnos <u>deben observar el estado de las células,</u> <u>antes y después de la incubación con el agente que provoca la muerte celular por apoptosis.</u>

#### Organización e implementación previas de la práctica

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

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

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

#### **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 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, <u>deben ser neutralizados</u> 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, <u>debemosañadir</u>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 deuna 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>1</u>	15 min	15-30 min
<u>II</u>	10-15 min	30-45 min
<u> 111</u>	15 min	45-60 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: Inducción de la apoptosis en células Sf9	Suministrar información	Al inicio de la práctica	5 min
Módulo III: Obtención del homogenado celular	Preparar y distribuir los materiales	Una hora 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.

<u>NOTA:</u>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.

#### INICIODEL 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)Preparación de alícuotasdel medio decultivo de célulasy del medio de reacción

Medio de cultivo de las células

- **1.ALICUOTAR** asépticamente, para cada grupo de alumnos, **10 ml** de **Medio de cultivo para células** enun tubo de 15 ml, previamente identificados. Reserve el medio restante para iniciar el cultivo de células de insectos.
- 2.ALICUOTAR asépticamente, para cada grupo de alumnos, 10 ml de Medio de reacción en seis tubos de 15 ml previamente identificados.
- 3. **ALICUOTAR2 ml del tampón de lisis** en cada uno de los seis tubos de 15 ml, marcados correspondientemente.
- 4. COMPROBAR la **ETIQUETA**en cada tubo como **Medio de cultivo, Medio** de reacción o bien como tampón de lisis.
- 5. **ALMACENAR** a 4 ° C hasta que los estudiantes lo necesiten en el <u>Módulo</u> <u>II y Módulo III</u>.

#### c) Iniciodel cultivo de las células recibidas

Las células de insecto Sf9 se envían en cuatrovialesque se deben transferir dos de ellos a uno de los frascos de cultivode 75 cm² y los otros dos al otro frasco, 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**9ml** de medio de cultivo de células de insecto a cadafrasco de cultivo -de 75 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 de dos viales de células de insecto Sf9 a unfrasco (estéril) de cultivo celular. Hacer lo mismo con los otros dos viales de células recibidos.

<u>NOTA:</u>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 10 ml de medio de cultivo de células de insecto nuevo precalentado a 27°C o atemperado en el mismo laboratorio.

Las células deben dellegar 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: ☐Máscara facial \_\_Guantes Etanol al 70% Bata de laboratorio PREPARACIÓN MÓDULO II: INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS SF9 Módulo II-1: 1. SACAR de la nevera las alícuotas del medio de cultivo de las células de insecto y dejarlas 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% Pipetas estériles pasteur oxdotVaso de precipitados para la eliminación de residuos Rascadores de placas ☐Medio de cultivo completo Pipetas de volumen variable Puntas de pipeta (estériles) ☐Tubos de 15 ml (estériles) □Cámara de Neubauer □Pipetas de 10 ml (estériles) □Placas de cultivo de 60 mm

#### Módulo II-2:

☐ Tubos de 50 ml (estériles)

- 1. **SACAR** de la nevera las alícuotas del medio de reacción y dejarlas 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 Reacción	Solución de etanol	
Pipetas de volumen variable	Puntas de pipeta (estériles)	
Solución de Actinomicina	☐Tubos de 15 ml (estériles)	
Pipetas de 10 ml (estériles)		
PREPARACIÓN MÓDULO III: OBTENCIÓN DEL HOMOGENADO CELULAR  1.SACAR de la nevera las alícuotas del medio de cultivo de las células de insecto y dejarlas calentar a temperatura ambiente.  2. REPARTIR los componentes necesarios para cada grupo.  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	Rascadores de placas	
Pipetas de volumen variable	Puntas de pipeta (estériles)	
Cámara de Neubauer	☐Tubos de 15 ml (estériles)	

☐ Pipetas de 10 ml (estériles)

Placas de cultivo de 12 pocillos



Registro de datos

GRUPO NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES FECHA