

# **GUIÓN DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Curso 2005-2006**

**Ricardo Pedro Casaroli-Marano**

**Departament de Biologia Cel.lular**

**Universitat de Barcelona**

*versión revisada: Septiembre 2005*

Las Prácticas de Biología Celular 2005-2006, tienen como *objetivo principal* introducir al alumno los conceptos y las técnicas básicas del día a día del laboratorio de Biología Celular. Para ello se ha diseñado una serie de actividades prácticas con las técnicas más frecuentemente utilizadas en la manipulación de los cultivos celulares y algunas aproximaciones ampliamente empleadas en la investigación en Biología Celular. Asimismo, se ha intentado enfocar la aplicabilidad de dichas manipulaciones a las técnicas de validación *in vitro* que, vienen sustituyendo progresivamente las manipulaciones animales *in vivo*.

Las prácticas están organizadas en 5 sesiones consecutivas de 6 horas de duración, a lo largo de una semana. Las 4 primeras sesiones, se realizarán en el Laboratorio del Departamento de Biología Celular (Edificio Anexo, planta -1, Laboratorio 22) y parte de la última, en la Aula de Informática (Aulario, Facultad de Biología). Cada sesión está estructurada en una breve introducción teórica de los conceptos más importantes y básicos, necesarios para la mejor comprensión y desarrollo de la parte experimental que se hará a la continuación. Dicha parte experimental constará de actividades individuales y experimentos en grupos. Asimismo, al final de cada sesión de este *Guión de Prácticas*, se podrá encontrar un cuestionario que ayudará a sedimentar los aspectos prácticos más relevantes de la sesión.

Para el buen aprovechamiento de las prácticas se recomienda *leer previamente la sesión correspondiente* en el guión. Además, se realizará un *control de asistencia* del alumnado (ver hoja de asistencia en la última página del guión).

Ricardo Pedro Casaroli-Marano  
Coordinador de Prácticas de Biología Celular

**ÍNDICE****SEGURIDAD Y RECOMENDACIONES EN EL LABORATORIO. PAG-4****Contenido Teórico****PRÁCTICA 1: Introducción a los cultivos celulares (parte I). PAG-7**

- 1.1. Introducción teórica a las técnicas y conceptos en cultivos celulares.
- 1.2. Introducción a las técnicas de descongelación y siembra de células para cultivos.
- 1.3. Introducción a las técnicas de contaje y cálculo de la viabilidad celular.
- 1.4. Introducción al citoesqueleto. Principales fármacos de acción sobre los microfilamentos y microtúbulos.

**PRÁCTICA 2: Introducción a las técnicas de inmunocitoquímica. PAG-17**

- 2.1. Introducción a las técnicas de inmunocitoquímica.
- 2.2. Introducción a la microscopia de epifluorescencia.

**PRÁCTICA 3: Introducción a los cultivos celulares (parte II). PAG-26**

- 3.1. Introducción a las técnicas de descongelación de líneas y siembra de cultivos de células.
- 3.2. Introducción a las técnicas de tripsinización de líneas celulares y elaboración de *stocks*.

**PRÁCTICA 4: Introducción a los ensayos de validación *in vitro*. PAG-36**

- 4.1. Introducción a los ensayos de validación *in vitro*.

**PRÁCTICA 5: Aplicaciones informáticas en Biología Celular. PAG-44****Contenido Práctico (Procedimientos y Metodología)****PRÁCTICA 1**

- A. Descongelación y siembra de células NRK (Normal Rat Kidney) **PAG-7**
- B. Descongelación y siembra de células NRK sobre cubreobjetos para las técnicas de inmunocitoquímica. **PAG-8**
- C. Descongelación y siembra de células NRK para un ensayo de cicatrización "in vitro" (scratch test). **PAG-8**
- C. Cálculo del número de esferas de poliestireno de diferentes diámetros mediante la utilización de una Cámara de Neubauer. **PAG-12**
- Cuestionario. **PAG-16**

**PRÁCTICA 2**

- A. Aplicación y tratamiento de los cultivos celulares con fármacos. **PAG-17**
- B. Ensayo de cicatrización "in vitro" y comparación de soluciones cicatrizantes. **PAG-18**
- C. Fijación de los cubreobjetos para inmunocitoquímica. **PAG-19**
- D. Técnica de inmunocitoquímica (inmunofluorescencia indirecta) y técnica de marcado directo para células en cultivo sobre cubreobjetos. **PAG-20**
- E. Tinción celular con colorante vital y observación comparativa de la morfología celular. **PAG-22**
- Cuestionario. **PAG-24**

**PRÁCTICA 3**

- A. Descongelación y siembra de células NRK en placas con pocillos para cultivo celular para los ensayos de crecimiento y citotoxicidad *in vitro*. **PAG-26**
- B. Tripsinización de una placa de Petri con células NRK y elaboración de un *stock* celular para congelación y el mantenimiento de líneas celulares. **PAG-28**
- C. Cálculo del número de células de la suspensión y de la viabilidad del cultivo mediante la utilización de una Cámara de Neubauer y tinción con Azul de Tripán. **PAG-29**
- D. Siembra de células NRK en placas de pocillos para los ensayos de crecimiento y citotoxicidad *in vitro*. **PAG-30**
- E. Preparación de un *stock* para congelación y mantenimiento de una línea celular. **PAG-31**
- F. Aplicación y tratamiento de los cultivos celulares con fármacos para los ensayos de crecimiento y citotoxicidad celular. **PAG-32**
- Cuestionario. **PAG-35**

**PRÁCTICA 4**

- A. Ensayo de crecimiento celular mediante técnica del *Cristal Violet Dye Elution*. **PAG-36**
- B. Ensayo de Citotoxicidad mediante la técnica del WST-1. **PAG-39**
- Cuestionario. **PAG-43**

## **RECOMENDACIONES PARA EL BUEN DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS Y LA SEGURIDAD PERSONAL EN EL LABORATORIO.**

### **MICROSCOPIOS**

Los microscopios, una vez utilizados por los alumnos (un microscopio de campo claro para cada 2 alumnos) deben estar desconectados y tapados con sus respectivas fundas.

### **MICROSCOPIOS DE EPIFLUORESCENCIA**

Este año, se cuenta con dos microscopios de epifluorescencia localizados en el laboratorio de prácticas. Los profesores deben cuidar de la buena y correcta utilización de los microscopios así como de su mantenimiento durante las prácticas. Se recomienda seguir todas las instrucciones que se encuentran a disposición de los usuarios. Todas las irregularidades o incidencias observadas deben ser comunicadas a los profesores.

### **CABINAS DE FLUJO LAMINAR**

Las cabinas de flujo laminar presentan un sistema de descontaminación mediante rayos ultravioleta. (UV). El profesor de las sesiones de la tarde debe dejar la luz UV de la cabina de flujo laminar conectada durante la noche (ciclo de descontaminación), siendo desconectada por el profesor de la mañana a la primera hora o luego antes de iniciar la actividad en la cabina. Recordar que los rayos UV pueden provocar alteraciones en el ADN de las células, recomendándose evitar las exposiciones cutáneas.

### **ESTUFAS DE CULTIVO**

Los profesores y alumnos deben comunicar cualquier incidencia con relación a las estufas de cultivo celular que son esenciales para el desarrollo óptimo de las sesiones prácticas. Habrá dos estufas para los diversos experimentos: los *experimentos individuales* y para los *experimentos en grupo*. Con este sistema tendremos más controlado las contaminaciones, temperatura, CO<sub>2</sub>, etc. Observar siempre los niveles de CO<sub>2</sub> de las estufas y cualquier incidencia, actuar rápidamente, comunicándolo a los coordinadores. Observar el nivel de H<sub>2</sub>O de las estufas y reponer o avisar a los coordinadores. El H<sub>2</sub>O que utilizamos para las estufas tendrá que estar autoclavada previamente y suplementada con un bactericida, a fin de que se eviten las contaminaciones.

### **BAÑO DE AGUA**

Los baños de agua están localizados en los laterales de las picas. Se recomienda su desconexión al final de cada sesión de práctica, teniendo especial cuidado en *la sesión 4*, última de la semana en el laboratorio.

### **CONTENEDORES Y RECICLADO DE LOS RESIDUOS**

Es recomendable aclarar la importancia del tratamiento y el reciclaje de los residuos generados durante la actividad práctica. Se contará con contenedores específicos para el depósito y reciclado de los diferentes materiales de las prácticas.

1. Material Infeccioso (amarillo con tapa roja) en la cabina de flujo: debe depositarse todo material residual biológico no fijado, como por ejemplo: tubos con restos celulares, medios de cultivo contaminados, o material plástico en contacto con ello.

2. Soluciones fijadoras (contenedor blanco) en la campana extractora del laboratorio: residuos líquidos que contengan aldehídos.

3. Vidrio (contenedor negro) para restos de vidrio como portaobjetos, cubreobjetos, botellas rotas, etc.

4. Plástico (contenedor amarillo grande): restos de plástico generado en las poyatas (puntas, placas, etc) y tubos de las soluciones (eppendorf, Corning, Falcon, etc).

### SUSTANCIAS TÓXICAS

Las sustancias tóxicas que serán manipuladas en las diferentes sesiones son: **paraformaldehído** (sesión 2 y 4), **azul de tripán** (sesión 1 y 3) y la **bis-benzimida** (sesión 2), **solución A** (sesión 2) y **solución Z** (sesión 4). Se recomienda precaución durante su manipulación.

### REPOSICIÓN DEL MATERIAL (*Durante la Sesión 4*):

*Esta medida esencial, facilitará la labor de los profesores y agilizará la actividad de los alumnos de los grupos siguientes*

#### Profesores de los Grupos M (mañanas)

1. Reponer puntas estériles azules y amarillas en la cabina de flujo laminar.
2. Comprobar y reponer las existencias de PBS 100 mM estéril.
3. Comprobar y reponer los cubreobjetos y portaobjetos de las bandejas de subgrupos.
4. Controlar las existencias de PBS-Gly-Tritón X-100.
5. Avisar a los Coordinadores de las incidencias.

#### Alumnos de los Grupos M (mañanas)

1. Reponer los tubos eppendorf en los botes de cada subgrupo.
2. Tirar sus preparaciones y residuos en los contenedores correspondientes.
3. Organizar el espacio de trabajo al terminar las sesiones.

#### Profesores de los Grupos T (tardes)

1. Reponer los botes de tubos eppendorf estériles en la cabina de flujo laminar.
2. Comprobar y reponer las existencias de PBS 100 mM.
3. Comprobar y reponer las existencias de etanol 70% en la cabina de flujo laminar.
4. Controlar el sistema de CO<sub>2</sub>, temperatura y agua destilada de los incubadores de cultivos celulares.
5. Avisar a los Coordinadores de las incidencias.

#### Alumnos de los Grupos T (tardes)

1. Reponer las puntas amarillas en los racks de cada subgrupo.
2. Reponer los frascos de PBS 100 mM que habrá preparado el profesor.

3. Tirar sus preparaciones y residuos en los contenedores correspondientes.
4. Organizar el espacio de trabajo al terminar las sesiones.

**NO OLVIDAR:**

- \* Utilizar siempre la bata en el laboratorio. En el caso de que tengas gafas de seguridad, se aconseja utilizarlas.
- \* Mantenga siempre la atención mientras se encuentre en el laboratorio.
- \* En el caso de contacto (piel, ojos, etc.) con alguna de las sustancias que se manipula en las sesiones prácticas, lavar abundantemente con agua del grifo y notificar al profesor de la sesión.
- \* En el caso de heridas en consecuencia de las manipulaciones realizadas en las sesiones prácticas, notificar al profesor responsable de la sesión.
- \* En el caso de que se observe alguna irregularidad en el laboratorio (reactivos, aparatos, escapes, etc.), notificar al profesor responsable de la sesión.
- \* Comprobar regularmente los parámetros de temperatura, CO<sub>2</sub> y nivel de H<sub>2</sub>O de las estufas de cultivo. En el caso de que se constate alguna irregularidad o incidencia, notificarla.
- \* Desconectar el interruptor del baño de agua al finalizar la actividad en el laboratorio.
- \* Desconectar el interruptor de los microscopios de prácticas una vez acabada la observación.

**PRÁCTICA 1: Introducción a los cultivos celulares (parte I).**

**Objetivo:** Introducir los conceptos y las técnicas básicas de la manipulación de células en cultivo bajo condiciones de esterilidad.

**1.1. Introducción teórica a las técnicas y conceptos en cultivos celulares.****1.2. Introducción a las técnicas de descongelación y siembra de células para cultivos.**

\* Práctica Individual

**A. Descongelación y siembra de células NRK (Normal Rat Kidney)**

*material:*

- 1 alícuota de células NRK ( $2,5 \times 10^5$  células/vial)
- 1 placa de Petri de 35 mm de diámetro
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C
- Puntas azules estériles para pipeta automática

***procedimiento:***

1. Se descongela la alícuota de células NRK en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 1 minuto.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.
3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave.
4. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
6. Se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
7. Se transfiere la suspensión celular (1 ml) a una placa de Petri de 35 mm de diámetro.
8. Se añade 1,5 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril.
9. Se homogeniza la suspensión celular de la placa de Petri con movimientos rotatorios suaves con la finalidad de obtener una *siembra celular regular* (IMPORTANTE).
10. Incubar en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C).

\* Práctica en Grupo (4 personas)

**B. Descongelación y siembra de células NRK para un ensayo de cicatrización “in vitro” (scratch test).**

*material:*

- 2 alícuotas de células NRK ( $2,5 \times 10^5$  células/vial)
- 2 placas de Petri de 35 mm de diámetro
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C
- Puntas azules estériles para pipeta automática

***procedimiento:***

1. Se descongela la alícuota de células NRK en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 1 minuto.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.
3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave.
4. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
6. Se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
7. Se transfiere la suspensión celular (1 ml) a una placa de Petri de 35 mm de diámetro.
8. Se añade 1,5 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril.
9. Se homogeniza la suspensión celular de la placa de Petri con movimientos rotatorios suaves con la finalidad de obtener una *siembra celular regular* (IMPORTANTE).
10. Incubar en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C).

**C. Descongelación y siembra de células NRK sobre cubreobjetos para técnicas de inmunocitoquímica.**

*material:*

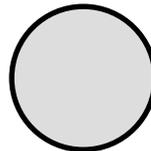
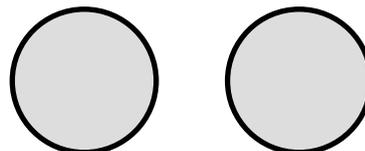
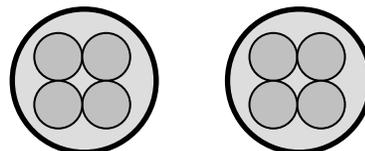
- 2 alícuotas de células NRK ( $2,5 \times 10^5$  células/vial)
- 2 placas de Petri de 35 mm de diámetro
- Cubreobjetos circulares de 10 mm de diámetro para técnicas de inmunocitoquímica.
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C
- Puntas azules estériles para pipeta automática

**procedimiento:**

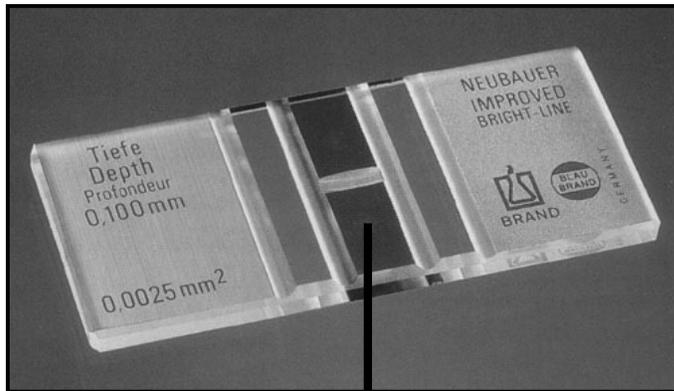
1. Se descongelan las alícuotas de células NRK en un baño de agua a 37°C durante aproximadamente 1 minuto.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a 37°C.
3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave.
4. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
6. Se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
7. Se transfiere la suspensión celular (1 ml) sobre los cubreobjetos en una Placa de Petri de 35 mm de diámetro. Cada placa de Petri contará con 4 cubreobjetos.
8. Se añade 1,5 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril.
9. Se homogeniza la suspensión celular de la placa de Petri con movimientos rotatorios suaves con la finalidad de obtener una *siembra celular regular* (IMPORTANTE)
9. Incubar en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C).

**Esquema de la siembra (sesión 1)**

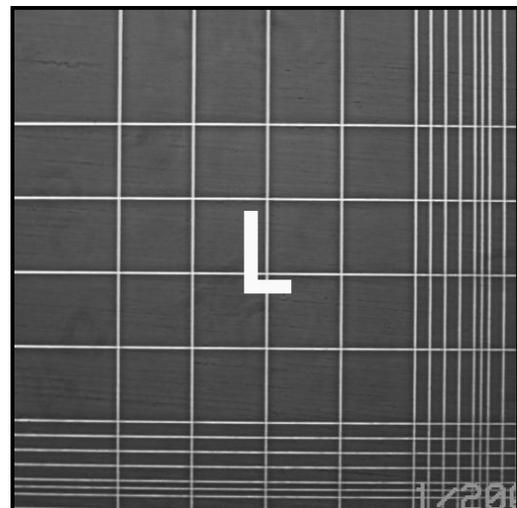
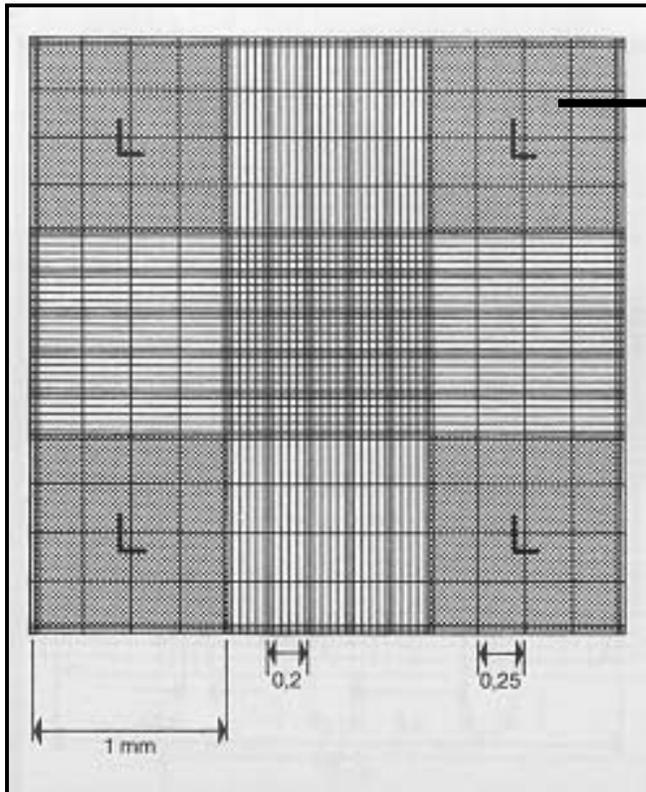
1 placa individual

2 placas / grupo  
ensayo de cicatrización2 placas / grupo  
técnica de inmunocitoquímica

### 1.3. Introducción a las técnicas de conteo (cámara de Neubauer) y viabilidad celular (azul tripán).



Cámara de Neubauer



#### Cálculo:

\* cada compartimiento: 1 mm X 1 mm X 0,1 mm (largo X ancho X fondo)

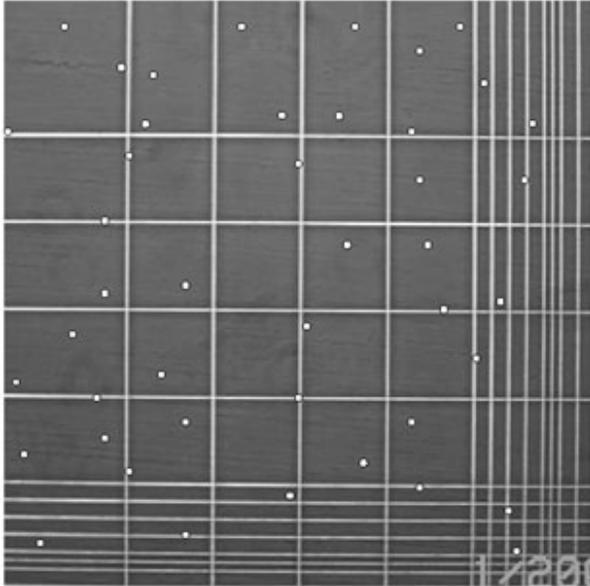
= 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µl

\* se obtiene el número de células en un volumen constante de 0,1 µl.

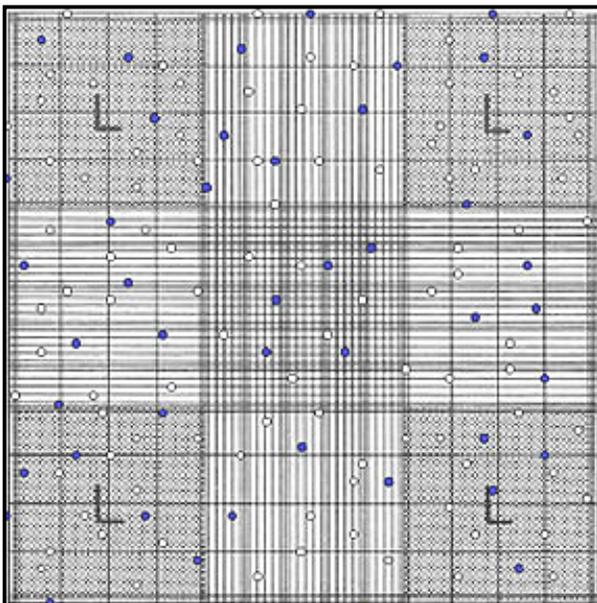
\* se cuentan los 4 compartimientos y se obtiene la media aritmética.

**Ejercicio 1: Simulación del contaje.**

Contar el número de esferas de poliestireno ( $10\ \mu\text{m}\ \varnothing$ ) que aparecen en el compartimiento de la Cámara de Neubauer de la figura. ¿Cómo se debe proceder con las esferas que aparecen sobre los bordes externos del compartimiento?

**Ejercicio 2: Simulación del contaje y cálculo de la viabilidad del cultivo.**

Se dispone de 3 ml de una suspensión de células endoteliales. Tras una tinción con Azul de Tripán (AT) (vol:vol), obtenemos el resultado que se observa en la Cámara de Neubauer. Calcular el número total de células de la suspensión y estimar la viabilidad de la suspensión celular (células oscuras = tinción positiva para AT).



\* Práctica en Grupo (2 personas)

**D. Cálculo del número de esferas de poliestireno mediante la utilización de una Cámara de Neubauer.**

*material:*

- 1 Cámara de Neubauer y cubreobjetos
- 1 Microscopio óptico de campo claro (objetivo X10)
- Suspensión de esferas de poliestireno (15  $\mu\text{m}$  de diámetro)
- Pipetas automáticas
- Solución de Azul de Tripán 0,25%

***procedimiento:***

1. Se homogeniza la suspensión de esferas de poliestireno.
2. Se aspira de 10 a 15  $\mu\text{l}$  de la suspensión en un eppendorf.
3. Se mezcla con el mismo volumen (10 a 15  $\mu\text{l}$ ) de la solución de Azul de Tripán.
4. Se homogeniza bien la suspensión con el colorante vital.
5. Se prepara la Cámara de Neubauer con el cubreobjeto.
6. Se rellenan los compartimientos de la Cámara de Neubauer por capilaridad, utilizándose la pipeta automática de bajo volumen. Se debe evitar la utilización de volúmenes inferiores a 10  $\mu\text{l}$  o superiores a 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión.
7. Se procede al recuento mediante observación con un microscopio óptico de campo claro y objetivo X10.

esferas	L1 (0,1 mm <sup>3</sup> )	L2	L3	L4	TOTAL/4
TOTAL					

**Ejercicio 3:** Simulación del recuento, cálculo de la viabilidad del cultivo y siembra. Tenemos 5 ml de una suspensión de células NRK. Necesitamos preparar placas de Petri de 8 cm de diámetro ( $s = \pi r^2$ ) a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup>. Para estimar la concentración de células de la suspensión inicial hemos mezclado 20  $\mu$ l de la suspensión con 20  $\mu$ l de Azul de Tripán (AT). El recuento con la Cámara de Neubauer fue el siguiente:

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>TOTAL/4</b>
<b>vivas</b>	76	73	74	77	
<b>AT +</b>	6	4	7	3	

Con base a estos resultados:

- Calcular el número total de células de la suspensión inicial.
- Calcular la viabilidad de la suspensión celular inicial.
- Calcular el volumen de la suspensión celular inicial que deberemos emplear en cada placa para obtener la densidad celular deseada.

### 1.4. Introducción al citoesqueleto. Principales fármacos de acción sobre los microfilamentos y microtúbulos.

**Tabla I:** Clasificación de las principales proteínas del citoesqueleto.

PROTEÍNA	CLASE	TIPO CELULAR	MASA MOLECULAR
Actina	microfilamento	mayoría	43 kDa
Tubulina ( $\alpha$ y $\beta$ )	microtúbulo	mayoría	50 kDa ( $\alpha$ ), 52 kDa ( $\beta$ )
Queratinas ácidas	FI (tipo I)	epitelial	40 – 60 kDa
Queratinas básicas y neutras	FI (tipo II)	epitelial	50 – 70 kDa
Vimentina	FI (tipo III)	mesenquimal	53 kDa
Desmina	FI (tipo III)	muscular	52 kDa
Periferina	FI (tipo III)	algunas neuronas	
Proteína Glial Ácida Fibrilar (GFAP)	FI (tipo III)	glial / astrocitos	51 kDa
Neurofilamentos (NF) L, M, H	FI (tipo IV)	mayoría neuronas	68 – 130 kDa
Internexina ( $\alpha$ )	FI (tipo IV)	algunas neuronas	66 kDa
Láminas nucleares A, B, C	FI (tipo V)	mayoría	65 – 75 kDa
Nestina	FI (tipo VI)	<i>stem cells</i> (SNC)	500 – 600 kDa

FI: filamento intermedio

SNC: sistema nervioso central

**Tabla II:** Principales fármacos de acción sobre los microfilamentos y microtúbulos.

FÁRMACO	ORIGEN	FUNCIÓN	ACCIÓN CELULAR
Colchicina	alcaloide <i>Colchicum autumnale</i> ; azafrán	antimitótico tratamiento Gota	inhibe la polimerización de la tubulina en microtúbulos
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i> ; tejo	antileucémico y antitumoral	promueve el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos
Citocalasina	metabolito <i>Zygosporium mansonii</i> (hongo)	investigación	bloquea la formación de microfilamentos e interfiere en la polimerización (ext +)
Latrunculina	toxina <i>Latrunculia magnifica</i> (esponja)	investigación (macrólido)	rompe la organización de los microfilamentos
Faloidina	toxina <i>Amanita phalloides</i>	investigación	unión lateral específica a microfilamentos estabilizando la polimerización

### Recomendaciones (Sesión 1)

1. Se condicionan las placas de Petri 35 mm (procedimiento 1C, página 8-9) con los cubres de 10 mm estériles antes de la siembra de las células con la ayuda de las pinzas de relojero previamente descontaminadas con etanol 70%. La maniobra se realiza en condiciones de esterilidad dentro de la cabina de flujo laminar.
2. Solución de poliestireno: Se prepara una dilución de la suspensión de esferas de poliestireno (15  $\mu\text{m}$  de diámetro) 1/20 con PBS 100 mM (12  $\mu\text{l}$  + 240  $\mu\text{l}$ ). Se reparte 25  $\mu\text{l}$  para cada subgrupo de 2 alumnos. Cada alumno toma de 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión y se añadirá el mismo volumen de la solución de Azul de Tripán (simulación, para el factor de dilución y cálculo) para rellenar la Cámara de Neubauer (procedimiento 1C, página 12).
3. Azul de Tripán: Se preparan 4 alícuotas de 80  $\mu\text{l}$  en un eppendorf y se distribuye 1 alícuota por poyata (para cada 4 alumnos) a fin de que se agilice la sesión.
4. Se guarda el medio de cultivo restante para ser utilizado en la práctica siguiente. Se mantiene a 4°C en la nevera.

## **Cuestionario 1**

1. ¿Cuáles son las dimensiones y volumen de la Cámara de Neubauer que hemos utilizado? ¿Cuál es la fórmula que debemos aplicar para volúmenes de 1 ml de suspensión?
2. ¿Qué error se ha podido cometer si al realizar un recuento con la Cámara de Neubauer se encuentran muy pocas esferas de poliestireno?
3. ¿Cuáles son los principales parámetros que deberemos tener en una estufa para cultivos de células (células de mamíferos) para que se den las condiciones óptimas para el crecimiento celular?
4. ¿Es posible estudiar la organización y/o la desorganización del citoesqueleto de actina o de tubulina en células vivas?
5. Citar algunos fármacos de acción sobre los microfilamentos de actina y su acción principal.
6. Citar algunos fármacos de acción sobre los microtúbulos y su acción principal.

## **PRÁCTICA 2: Introducción a las técnicas de inmunocitoquímica.**

**Objetivo:** Introducir los conceptos y la aproximación técnica básica para las técnicas de inmunocitoquímica sobre células en cultivo. Introducción a los tipos de técnica de marcaje con anticuerpos y moléculas específicas.

\* Práctica en Grupo (4 personas)

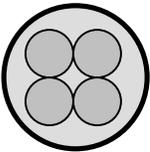
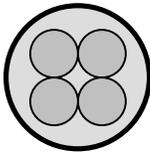
### **A. Aplicación y tratamiento de los cultivos celulares con fármacos.**

*material:*

- 2 cultivos celulares NRK de la sesión de prácticas anterior (Práctica 1)
- Fármacos A y B
- Pipetas automáticas de bajo volumen
- Puntas amarillas estériles para pipetas automáticas

***procedimiento:***

1. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad (puntas amarillas estériles), se diluyen los fármacos problema (16  $\mu$ l) y control (16  $\mu$ l) con 84  $\mu$ l de medio celular atemperado a 37°C.
2. Se aplican los fármacos (100  $\mu$ l) en las placas de Petri de 35 mm que contienen los cubreobjetos (10 mm de diámetro) sobre los cuales se sembraron las células NRK en la sesión de prácticas del día anterior. *Cada fármaco debe ser aplicado en un único cultivo celular.*
3. Se **etiquetan las placas** fármaco A o fármaco B.
4. Se homogeniza el medio celular de la placa de Petri con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pueda obtener una *mezcla regular del fármaco*.
5. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante 30 minutos.

Fármaco A	Fármaco B
	

Placas de Petri 35 mmm con cubreobjetos circulares

\* Práctica en Grupo (4 personas)

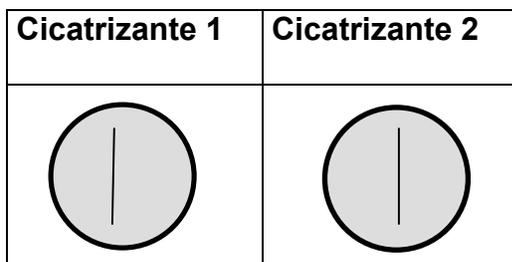
**B. Ensayo de cicatrización “in vitro” (scratch test) y comparación de soluciones cicatrizantes.**

*material:*

- 2 cultivos celulares NRK de la sesión de prácticas anterior (Práctica 1)
- Cicatrizante 1 y 2
- Pipetas automáticas de pequeño y gran volumen
- Puntas amarillas estériles para pipetas automáticas
- Puntas azules estériles para pipetas automáticas

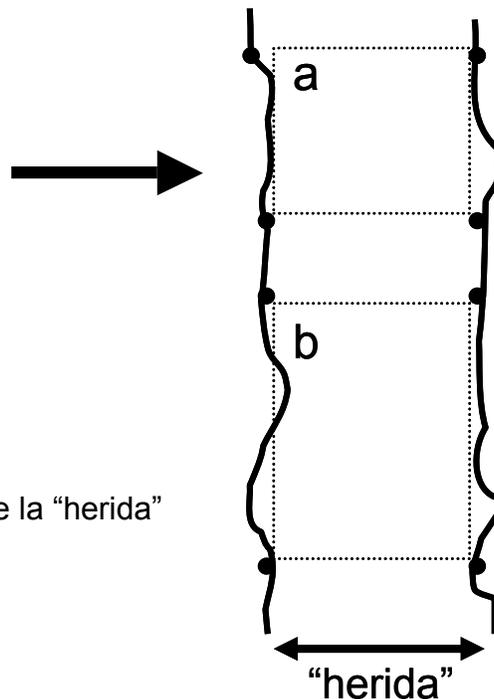
***procedimiento:***

1. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se realiza una “herida lineal” en la superficie del cultivo celular, con la ayuda de una punta amarilla estéril. Se recomienda que la herida sea la más regular posible.
2. Se aspira el medio de cultivo.
3. Se realiza un lavado cuidadoso con 1 ml de PBS 100 mM estéril (X2).
4. Se aplican los cicatrizantes 1 y 2 en las placas de cultivo celular. *Cada cicatrizante debe ser aplicado en un único cultivo celular.*
3. Se **etiquetan las placas** cicatrizante 1 o cicatrizante 2.
4. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante 30 minutos – 1 hora.
5. Se realiza el demarcado del área de observación con la ayuda de un rotulador y el microscopio invertido de contraste de fases (ver esquema).
6. Se realizan medidas de área repetidas cada 24 horas.



Placas de Petri 35 mm con la “herida lineal”

**a y b:** área de medida para el cierre de la “herida”



\* Práctica en grupo (4 personas)

**C. Fijación de los cubreobjetos para inmunocitoquímica.**

*material:*

- 2 cultivos celulares NRK tratados con el fármaco A y B
- Solución de fijación - Pipetas Pasteur desechables
- PBS 100 mM

***procedimiento:***

1. *Sobre la poyata:* se aspira el medio de cultivo de las placas de Petri que contienen las células NRK tratadas con el fármaco problema y control (puntas azules con pipeta automática de gran volumen).
2. Se lava rápidamente con 1 ml de PBS 100 mM (X2).
3. Se incuba con 1 ml de la solución de fijación durante 30 minutos a temperatura ambiente dentro de la cabina extractora. La solución fijadora se manipulará siempre con las pipetas Pasteur.
4. Se retira la solución de fijación y se deposita en el *recipiente de residuos* correspondiente.
5. Se lava con 1 ml de PBS 10 mM durante 5 minutos (X2).

**Obs:** La solución de fijación para las técnicas de inmunocitoquímica sobre cultivos celulares está compuesta de paraformaldehído al 2% + 1% de sacarosa en tampón fosfato 100 mM.

## 2.1. Introducción a las técnicas de inmunocitoquímica.

\* Práctica en grupo (4 personas)

### **D. Técnica de inmunocitoquímica (inmunofluorescencia indirecta) y técnica de marcaje directo para células en cultivo.**

#### **material:**

- Cubreobjetos con células NRK fijadas (tratamiento con los fármacos A y B)
- Solución de permeabilización (PBS 100 mM – glicina 20 mM – tritón X-100 0,1%)
- Solución de bloqueo (PBS 100 mM – glicina 20 mM – albúmina del suero bovino 1%)
- Faloidina-TRITC (isotiocianato de tetrametil-rodamina)
- Anticuerpo monoclonal contra Tubulina (anticuerpo primario)
- Anticuerpo secundario-FITC (isotiocianato de fluoresceína)
- Tinción nuclear: bis-benzimida (Hoescht ®)
- Medio de montaje para fluorescencia: Fluoromount ®
- PBS 100 mM

#### **procedimiento:**

1. *Sobre la poyata:* se incuban los cubreobjetos (problema y control) con 1 ml de la **solución de permeabilización** durante 10 minutos. Se utiliza la misma *placa de Petri (35 mm)*. Se separan siempre los cubreobjetos con el fármaco problema del control.
2. Se lavan durante 5 minutos con 1 – 2 ml de PBS 100 mM.
3. Los cubreobjetos se secan por capilaridad sobre papel de celulosa, con la ayuda de las *pinzas para cubreobjetos*, evitádo que los cubreobjetos se sequen por completo.
4. Se transfieren a una *placa de Petri (100 mm)* acondicionadas con juntas tóricas (*células boca arriba*) y se incuba cada cubreobjeto con 25 µl de la **solución de bloqueo** durante 10 minutos.
5. Se secan nuevamente por capilaridad sobre papel de celulosa evitando que los cubreobjetos se sequen por completo.
6. Se aplican 25 µl del **anticuerpo primario** (anti Tubulina) o la **Faloidina-TRITC**, en los cubreobjetos correspondientes (ver esquema del experimento) y se deja incubar a 37°C (incubador) durante 45 minutos.
7. Se lava durante 5 minutos con 1 ml de PBS 100 mM.
8. Se aplican 25 µl del **anticuerpo secundario**, en los cubreobjetos correspondientes, y se deja incubar a 37°C (incubador) durante 30 minutos, protegido de la luz.
9. Se lava durante 5 minutos con 1 ml de PBS 100 mM.
10. Se aplican 25 µl de la **solución para tinción nuclear** durante 7 minutos.
11. Lavado rápido por inmersión en PBS 100 mM.
12. Se seca por capilaridad sobre papel de celulosa.
13. Montaje de los cubreobjetos (*células boca abajo*) sobre un portaobjetos con 5 µl del **medio de montaje para fluorescencia**.
14. Se almacenan en posición horizontal, protegido de la luz.

Esquema del experimento:

*Experimento de inmunocitoquímica*

control (sol. bloqueo)	Faloidina- TRITC	Tubulina (mAbs)	FÁRMACO
			<b>A</b>
			<b>B</b>

procedimiento	soluciones	control	Faloidina	Tubulina
<b>paso 6</b>	mAbs Tubulina	no	no	sí
	Faloidina-TRITC	no	sí	no
	solución bloqueo	sí	no	no
<b>paso 8</b>	RaM-FITC	sí	-	sí
<b>paso 10</b>	bis-benzimida	sí	sí	sí

\* Práctica en grupo (4 personas)

**E. Tinción celular con un colorante vital (Cristal Violeta) y observación comparativa de la morfología celular.**

*material:*

- Cubreobjetos con células NRK fijadas tras el tratamiento con el fármaco problema y control
- Solución de Cristal Violeta al 0,25%
- PBS 100 mM

***procedimiento:***

1. *Sobre la poyata:* se incuban los cubreobjetos (problema y control) con 30  $\mu$ l de la **solución de Cristal Violeta** durante 15 minutos. Se separan los cubreobjetos con el fármaco problema del control.
2. Lavado rápido por inmersión en PBS 100 mM.
3. Los cubreobjetos se secan por capilaridad sobre papel de celulosa y se dejan secar completamente en contacto con el aire (*células boca arriba*).
4. Montaje de los cubreobjetos (*células boca abajo*) con 5  $\mu$ l del **medio de montaje**.
5. Se observa la preparación con el microscopio de campo claro.

Esquema del experimento:

*Experimento tinción con Cristal Violeta*

<b>Cristal Violeta</b>	<b>FÁRMACO</b>
	<b>A</b>
	<b>B</b>

**2.2. Introducción a la microscopía de epifluorescencia.**

-práctica individual: observación de resultados

### Recomendaciones (Sesión 2)

1. Solución fijadora: Se aconseja antes de iniciarse la sesión, colocar la solución fijadora en el baño a 37°C. **NO DEJAR LA SOLUCIÓN FIJADORA DENTRO DE LA NEVERA A 4°C.** El profesor dividirá la solución fijadora en 4 alícuotas de 3 ml (tubos de tapón verde) y repartir 1 alícuota para cada subgrupo de 4 alumnos.
2. Solución de bloqueo: El profesor prepara 4 eppendorfs con 300 µl de la solución de bloqueo. Se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
3. Mabs anti-β tubulina: dilución 1/50 (6 µl + 294 µl solución de bloqueo). El profesor prepara 4 eppendorfs con 70 µl de la dilución y se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
4. Faloidina-TRITC: dilución 1/200 (2 µl + 398 µl solución de bloqueo). El profesor prepara 4 eppendorfs con 90 µl de la dilución y se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
5. RaM-FITC: dilución 1/50 (10 µl + 490 µl solución de bloqueo). El profesor prepara 4 eppendorfs con 120 µl de la dilución y se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
6. El profesor prepara la solución de bis-benzimida (tinción nuclear) añadiéndose 995 µl de PBS 10 mM en el eppendorf correspondiente, que contiene 5 µl de bis-benzimida 1 mM. Se preparan 4 eppendorfs con 250 µl de la solución y se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
7. Cristal Violeta: El profesor prepara 4 eppendorfs con 400 µl de la solución de cristal violeta. Se reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
8. Soluciones Cicatrizantes 1 y 2: El profesor prepara 4 tubos verdes estériles con 3 ml de las soluciones cicatrizantes respectivas. Se reparte 1 tubo para cada subgrupo de 4 alumnos.
9. Los volúmenes de incubación sobre los cubreobjetos (10 mm) serán de 25 µl.
10. Las placas se fijan a la temperatura ambiente dentro de la cabina extractora de gases.
11. Se deposita las soluciones fijadoras en la botella de residuos (etiquetada PF) que esta dentro de la cabina extractora de gases.

## Cuestionario 2

1. ¿Cuáles son las ventajas y las desventajas del proceso de fijación de las células en las técnicas de inmunocitoquímica?
2. ¿Por qué realizamos una *permeabilización* de las células en las técnicas de inmunocitoquímica? ¿Este paso es siempre necesario?
3. ¿Por qué se realiza el bloqueo previamente a la incubación con los anticuerpos? ¿En qué consiste?
4. Las etapas realizadas en la técnica de inmunocitoquímica han sido: *montaje, bloqueo, fijación, permeabilización, incubación con el anticuerpo secundario, incubación con el anticuerpo primario o moléculas afines, tinción del núcleo, y la observación*. ¿Cuál es la secuencia lógica de cada una de estas etapas en dicha técnica?
5. En las técnicas de inmunocitoquímica ¿por qué hemos realizado las incubaciones con los anticuerpos y moléculas afines a 37°C? ¿Esta medida es siempre necesaria?
6. ¿Qué característica debe tener un medio de montaje para la microscopia de epifluorescencia como el Fluoromount®?
7. ¿Cuál es el objetivo de introducir cubreobjetos controles en las técnicas de inmunocitoquímica?
8. ¿Podrías detectar los antígenos siguientes con los anticuerpos (Ac) que se indican? ¿Cuál sería en color de la fluorescencia emitida en el marcado?
  - a. Ac anti-X producido en ratón con  
Ac anti-Ig de conejo (producido en cabra) conjugado con fluoresceína (FITC).
  - b. Ac anti-X producido en conejo con  
Ac anti-Ig de conejo (producido en vaca) conjugado con rodamina (TRITC).
  - c. Ac anti-Z producido en conejo con  
Ac anti-Ig de conejo (producido en rata) conjugado con fluoresceína (FITC)
  - d. Ac monoclonal anti-V con  
Ac anti-Ig de conejo (producido en cobayo) conjugado con *Texas Red*
  - e. Ac monoclonal anti-V con  
Ac anti-Ig de ratón (producido en conejo) conjugado con Cianina

9. De las siguientes combinaciones de anticuerpos (Ac) señala cuáles **sí** o cuáles **no** nos permitirían inmunolocalizar a las proteínas X e Y con técnicas de doble marcado?

GRUPO	Ac primario	Ac secundario	
1	MaX + RaY	GaR-FITC + GaR-TRITC	
2	MaX + GaY	GaM-FITC + GaM-TRITC	
3	GaX + MaY	GaR-Cy + GaM-TxR	
4	RaX + MaY	GaR-FITC + GaM-TxR	
5	MaX + MaY-FITC	GaM-TRITC	
6	MaX + RaY	GaM-Cy + GaR-TxR	
7	MaX-Cy + MaY-TRITC		
8	MaX-FITC + RaY	GaR-TxR	
9	MaX-TRITC + RaY	GaR-TxR	
10	MaX-Cy + GaY	GaR-TRITC	

FITC: fluoresceína; TRITC: rodamina; Cy: cianinas; TxR: *Texas Red*  
**M** (*mouse*): ratón; **R** (*rabbit*): conejo; **G** (*goat*): cabra

10. Hemos realizado una inmunodetección simultánea de actina y de la proteína nuclear RPM3 sobre células NRK en cultivo. Contra los microfilamentos de actina hemos utilizado un Ac policlonal producido en conejo y como Ac secundario, Igs de ratón contra conejo (*Mouse anti Rabbit*) conjugado con fluoresceína (FITC). Para la proteína RPM3 hemos utilizado un Ac monoclonal y los detectamos mediante Igs de cabra contra ratón (*Goat anti Mouse*) conjugados con *Texas Red* (TxR). El resultado obtenido fue sorprendente: los filamentos de actina se observaban teñidos de verde y rojo mientras el núcleo aparecía marcado de rojo. ¿Podríamos deducir que parte de la proteína RPM3 también se encuentra en el citoesqueleto unida a los microfilamentos de actina?

**PRÁCTICA 3: Introducción a los cultivos celulares (parte II)**

**Objetivo:** Introducir los conceptos y las técnicas básicas de la manipulación de células en cultivo bajo condiciones de esterilidad.

**3.1. Introducción a las técnicas de descongelación de stocks y siembra de cultivos de células.**

\* Práctica en Grupo (4 personas)

**A. Descongelación y siembra de células NRK (Normal Rat Kidney) en placas con pocillos para cultivo celular.** Se descongelarán 3 alícuotas de células NRK por grupo y se sembrarán 2 placas de 24 pocillos (8 pocillos/placa) para ensayos de crecimiento y citotoxicidad *in vitro*.

*material:*

- 3 alícuotas de células NRK ( $2,5 \times 10^5$  células/vial)
- 2 placas de 24 pocillos (área =  $1,9 \text{ cm}^2$  / pocillo)
- Medio de cultivo celular atemperado a  $37^\circ\text{C}$
- Tubo Corning de 15 ml
- Pipetas automáticas con puntas azules estériles

***procedimiento:***

1. Se descongelan las alícuotas de células NRK en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 1 minuto.
2. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se añade con una punta azul estéril, 1 ml del medio de cultivo celular atemperado a  $37^\circ\text{C}$ .
3. Se homogeniza la suspensión mediante agitación suave.
4. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
5. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
6. Se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a  $37^\circ\text{C}$  con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves.
7. Se transfieren las suspensiones celulares (1 ml / eppendorf X 3 = 3 ml) a un tubo Corning de 15 ml estéril.
8. Se añaden 2 ml del medio de cultivo celular atemperado (Volumen total = 5 ml)
9. Se homogeniza la suspensión celular del tubo Corning con agitación suave (**MUY IMPORTANTE**) para así obtener una *suspensión de densidad celular homogénea*.
10. Se siembra (**Siembra A**) un volumen de 0,3 ml de la suspensión celular por pocillo (según el esquema abajo). Se aconseja utilizar una pipeta automática de gran volumen con punta azul estéril.
11. Se homogeniza la siembra con movimientos suaves rotatorios de la placa a fin de que se pueda obtener una *siembra celular regular* (**MUY IMPORTANTE**)
12. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5%  $\text{CO}_2$ , 95% aire, 90% humedad,  $37^\circ\text{C}$ ).

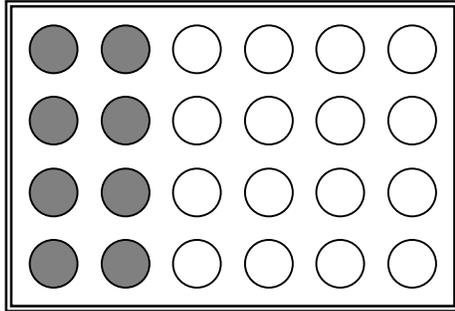
Esquema del experimento:

**Placa 1:** *Ensayo de Crecimiento Celular*

**Placa 2:** *Ensayo de Citotoxicidad*

densidad de siembra = 22.500 células / cm<sup>2</sup>

aproximadamente 45.000 células / pocillo



○ Pocillos libres

● Siembra A

### 3.2. Introducción a las técnicas de tripsinización de cultivos celulares y elaboración de stocks.

\* Práctica Individual

#### **B. Tripsinización de una placa de Petri (35 mm) con células NRK (Normal Rat Kidney) y elaboración de un stock celular para congelación.**

*material:*

- Placa de Petri (35 mm) con células NRK (práctica 1)
- Solución de Tripsina 0,05% - EDTA 0,02% atemperada a 37°C
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C
- Pipetas automáticas con puntas azules estériles

***procedimiento:***

1. Se atempera la solución de tripsina-EDTA en un baño de agua a 37°C.
2. Se observa la *morfología fibroblástica* de las células NRK en cultivo (placa de Petri de 35 mm) mediante microscopia de contraste de fases.
3. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se aspira el medio de cultivo de la placa con la ayuda de una punta azul estéril.
4. Se lava el cultivo celular rápidamente con 1 ml de PBS 100 mM estéril con la ayuda de una punta azul estéril (X2). *Aspirar totalmente el PBS (IMPORTANTE)*
5. Se añade 250 µl de la solución de tripsina-EDTA atemperada a 37°C.
6. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante 3 a 5 minutos.
7. Se observa la *morfología redondeada* de las células mediante microscopia de contraste de fases.
8. En la cabina de flujo laminar, se inactiva la acción de la tripsina añadiéndose 1 ml del medio de cultivo atemperado a 37°C.
9. Se realizan maniobras sucesivas de aspiración-expulsión del medio de cultivo, a fin de que se origine un discreto flujo de arrastre (maniobra de "lavado") sobre la superficie de la placa con el objeto de despegar las células. Se recomienda la utilización de puntas azules estériles y pipeta automática. Se intenta evitar la formación de espuma en la maniobra.
10. Se recoge la suspensión celular en un eppendorf estéril (volumen total = 1,25 ml).
11. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
12. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
13. Se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio de cultivo celular atemperado a 37°C con la ayuda de una punta azul estéril mediante aspiraciones sucesivas suaves o mediante movimientos suaves de inversión (IMPORTANTE).
14. Se procede al recuento celular con la cámara de Neubauer y se calcula la viabilidad del cultivo celular.

## \* Práctica Individual

**C. Cálculo del número de células de la suspensión y de la viabilidad del cultivo mediante la utilización de una Cámara de Neubauer y tinción de Azul de Tripán****material:**

- 1 Cámara de Neubauer
- 1 Microscopio óptico de campo claro (objetivo X10)
- Suspensión de células NRK
- Pipetas automáticas
- Cubreobjetos para Cámara de Neubauer
- Solución de Azul de Tripán 0,25% (AT)

**procedimiento:**

1. Se homogeniza la suspensión de células NRK (**IMPORTANTE**).
2. Se aspira entre 10 a 15  $\mu$ l de la suspensión en un eppendorf.
3. Se mezcla con el mismo volumen (10 a 15  $\mu$ l) de la solución de AT.
4. Se homogeniza bien la suspensión celular con el colorante vital (**IMPORTANTE**).
5. Se prepara la Cámara de Neubauer con los cubreobjetos.
6. Se rellena los compartimientos de la Cámara de Neubauer por capilaridad, utilizándose la pipeta automática. Se recomienda la utilización de un volumen entre 10 y 20  $\mu$ l. No utilizar volúmenes inferiores a 10  $\mu$ l o superiores a 20  $\mu$ l.
7. Se procede al recuento mediante la utilización del microscopio óptico de campo claro con su objetivo X10.
8. Cálculo del número de células (células totales) de la suspensión y de la viabilidad celular del cultivo (% de células vivas)
9. Cálculo de la densidad celular necesaria para la realización de la práctica del **apartado D**. Las células restantes serán utilizadas para la preparación de un **stock** celular para congelación (**apartado E**)

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>TOTAL/4</b>
<b>vivas</b>					
<b>AT +</b>					

\* Práctica en Grupo (4 personas)

**D. Siembra de células NRK en pocillos (4 pocillos / placa) de las 2 placas de 24 pocillos sembradas al inicio de la práctica para los ensayos de crecimiento y citotoxicidad in vitro.**

*material:*

- Suspensión de células NRK
- Pipetas automáticas
- 2 placas de 24 pocillos (área = 1,9 cm<sup>2</sup> / pocillo)
- Medio de cultivo celular atemperado a 37°C
- Tubo Corning de 15 ml
- Pipetas Pasteur de plástico estériles

***procedimiento:***

1. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se recogen las suspensiones celulares restantes en el tubo Corning estéril del inicio de la práctica, a fin de que se origine un *pool* de las suspensiones celulares de los componentes del grupo de trabajo.
2. Se recalcula el número total de células de la suspensión. Se repite el procedimiento descrito en el **Apartado C** con el objeto de comprobar el valor estimado del número total de células NRK del pool, con el valor real (suma del número de células obtenidas individualmente).
3. Se siembra directamente, con el volumen de la suspensión correspondiente a la densidad celular deseada (**densidad de 45.000 células / pocillo**) y posteriormente, se añade el volumen de medio de cultivo celular suficiente para **0,3 ml**.
4. Se *homogeniza la suspensión celular* del tubo Corning con movimientos suaves de agitación (**MUY IMPORTANTE**) a fin de que se pueda obtener una *suspensión celular de densidad homogénea*.
8. Se siembra (**Siembra B**) el volumen de 0,3 ml de la suspensión celular por pocillo (según el esquema abajo) y respetando la densidad celular requerida.
9. Se homogeniza la siembra con movimientos suaves rotatorios de la placa a fin de que se pueda obtener una *siembra celular regular* (**MUY IMPORTANTE**)
10. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C).

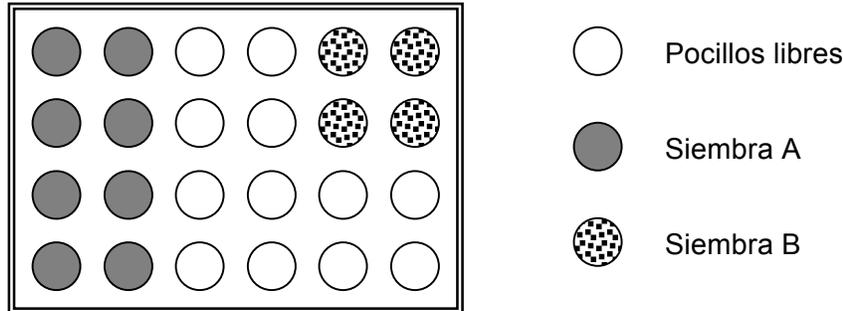
Esquema del experimento:

**Placa 1: Ensayo de Crecimiento Celular**

**Placa 2: Ensayo de Citotoxicidad**

densidad de siembra = 22.500 células / cm<sup>2</sup>

aproximadamente 45.000 células / pocillo



\* Práctica Individual

**E. Preparación de un stock de células NRK para congelación y mantenimiento de la línea celular.**

*material:*

- Suspensión de células NRK
- Pipetas automáticas
- Solución de Congelación

***procedimiento:***

1. En la cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad y en un eppendorf estéril se deposita el volumen de suspensión correspondiente a 10<sup>5</sup> células NRK.
2. Se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm (600 – 700 g).
3. En la cabina de flujo laminar, se descarta el sobrenadante por decantación.
4. Se resuspende el *pellet* celular con 250 µl de la solución de congelación mediante la utilización de una pipeta automática con punta azul estéril.
5. Se homogeniza la suspensión celular.
6. Se congela progresivamente a -20°C durante 3 a 6 horas.
7. Se pasa a - 80°C durante 3 días.
8. Se conserva a - 196°C (N<sub>2</sub> líquido) durante tiempo indeterminado.

**Obs:** La solución de congelación (crioprotectora) contiene 50% de Suero Bovino Fetal + 40% medio de cultivo celular + 10% Dimetil Sulfoxido (DMSO) (vol:vol:vol)

\* Práctica en Grupo (4 personas)

**F. Aplicación y tratamiento de los cultivos celulares con fármacos para los ensayos de crecimiento y citotoxicidad celular.**

*material:*

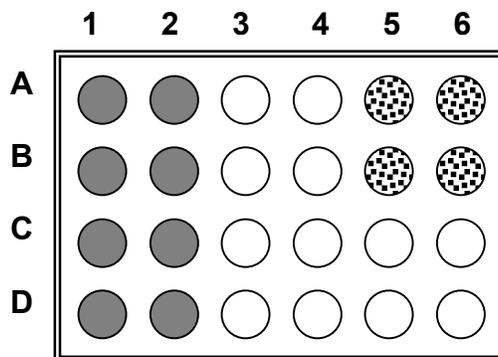
- 2 placas de cultivos celulares NRK del inicio de la práctica
- Soluciones de 1 a 5 (controles y problemas)
- Pipetas automáticas
- Puntas azules estériles para cultivo celular
- Puntas amarillas estériles para cultivo celular

**procedimiento:**

1. Se atemperan las **soluciones de 1 a 3** a 37°C en un baño de agua.
2. *Consultar la llave* correspondiente al experimento de la **Placa 1**. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad (puntas azules estériles), se aspira cuidadosamente el medio de cultivo celular de los pocillos.
3. Se aplican las soluciones (por duplicado) en los pocillos correspondientes y según el esquema del experimento **Placa 1**. Cada molécula debe ser aplicada en su pocillo correspondiente (esquema del experimento **Placa 1**).
4. Se etiqueta la placa y la secuencia de moléculas en los pocillos (por duplicado).
5. Se homogeniza el medio celular de la placa de Petri con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pueda obtener una *mezcla regular de las moléculas* en el medio de cultivo. (**IMPORTANTE**)
6. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante toda la noche.

Esquema del experimento:

**Placa 1: Ensayo de Crecimiento Celular**



A1, A2, A5, A6: *no se toca* y se mantiene la situación.

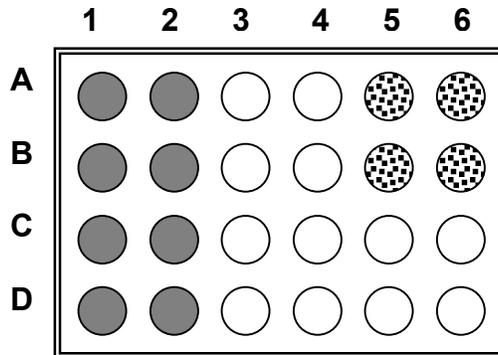
\* **control del experimento.**

B1, B2: *se aspira* y *se añade* 300 µl / pocillo de la **solución 1**

B5, B6: *se añade* directamente 300 µl / pocillo de la **solución 1**

C1, C2: *se aspira* y *se añade* 300 µl / pocillo de la **solución 2**

D1, D2: *se aspira* y *se añade* 300 µl / pocillo de la **solución 3**

**Placa 2: Ensayo de Citotoxicidad**

A1, A2, A5, A6: no se toca y se mantiene la situación.

\* **control del experimento.**

B1, B2: se añade directamente 33  $\mu$ l / pocillo de la **solución 4** (SDS 0,2%)

\* **control positivo para la citotoxicidad.**

B5, B6: no se toca y se mantiene la situación.

\* se añadirá el fármaco problema al día siguiente (ver *Práctica 4*)

C1, C2: se añade directamente 33  $\mu$ l / pocillo de la **solución 5** (NaCl 0,1 M)

\* **control negativo para la citotoxicidad.**

D1, D2: no se toca y se mantiene la situación.

\* se añadirá el fármaco problema al día siguiente (ver *Práctica 4*)

**Obs:** (Ensayo de Citotoxicidad) En los ensayos de tipo colorimétricos es muy importante que los volúmenes finales en cada uno de los pocillos sean los más ajustados posibles. Así, para la mejor interpretación de los resultados de lectura que se obtendrán, se recomienda añadir 33  $\mu$ l / pocillo del medio de cultivo celular atemperado en los pocillos restantes (A1, A2, A5, A6, B5, B6, D1 y D2).

### Recomendaciones (sesión 3)

1. Se recomienda al iniciarse la sesión, atemperar el medio de cultivo, la solución de tripsina/EDTA y las soluciones de 1 a 5.
2. PBS 100 mM estéril: Se recomienda que el profesor separe 45 ml de PBS 100 mM estéril en un Tubo Falcon (estéril) para el trabajo del grupo. Se realiza la maniobra bajo flujo laminar. Es recomendable que se atempere a 37°C para el lavado de los cultivos antes de la trypsinización.
3. Azul de Tripán: El profesor prepara 4 eppendorfs con 80 µl de la solución y se entrega 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
4. Solución 1 (NRK – FCS): El profesor prepara 4 tubos (tapón verde) estériles con 2 ml de la solución y reparte 1 tubo para cada subgrupo de 4 alumnos.
5. Solución 2 (NRK + 5% FCS): El profesor prepara 4 eppendorfs estériles con 0,8 ml de la solución y reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
6. Solución 3 (NRK + 20% FCS): El profesor prepara 4 eppendorfs estériles con 0,8 ml de la solución y reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
7. Solución 4 (SDS 0,2%): El profesor prepara 4 eppendorfs estériles con 90 µl de la solución y reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos. El SDS se precipita a 4°C por lo que se debe dejarlo a RT o atemperarlo a 37°C durante 15 – 30 minutos antes de dividirlo en alícuotas.
8. Solución 5 (NaCl 0,1 M): El profesor prepara 4 eppendorfs estériles con 90 µl de la solución y reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.
9. Medio de Cultivo: Se guarda el medio de cultivo restante para ser utilizado en la práctica siguiente caso sea necesario. Se mantiene a 4°C en la nevera.
10. Se recuerda realizar las medidas de área relacionadas al experimento de cicatrización *in vitro*.

### **Cuestionario 3**

1. ¿Qué error se ha podido cometer cuando al haber realizado un recuento con la Cámara de Neubauer se encuentran muy pocas células?
2. ¿Para qué se utiliza la *técnica de tripsinización* de células en cultivo? ¿Cómo se puede inactivar la acción de la tripsina sobre las células?
3. ¿Por qué se recomienda utilizar la solución de tripsina atemperada a 37°C en la técnica de tripsinización de células en cultivo?
4. ¿Qué función y limitación presenta el dimetilsufoxido (DMSO)?
5. ¿Para qué se utiliza la *tinción del Azul de Tripán* asociada a la técnica de tripsinización de células en cultivo? ¿Cómo actúa el Azul de Tripán sobre las células?
6. Una vez obtenidos los *stocks* celulares, ¿cuál es la secuencia de pasos que se recomienda para la congelación y mantenimiento de los mismos? ¿Por qué?

**PRÁCTICA 4: Introducción a los ensayos de validación *in vitro*.**

**Objetivo:** Introducción a los conceptos básicos y las aproximaciones técnicas básicas utilizadas en los *ensayos de validación in vitro*.

**4.1. Introducción a los ensayos de validación (citotoxicidad, crecimiento, adhesión, migración y proliferación celular) *in vitro*.**

\* Práctica en grupo (4 personas)

**A. Ensayo de crecimiento (proliferación) celular mediante la técnica del Cristal Violet Dye Elution (CVDE).**

**Introducción:** La técnica del *Cristal Violet Dye Elution* (CVDE), nos permite valorar de una forma rápida y sencilla la masa celular total de un cultivo celular. El método se basa en la tinción de las células con una solución al 0,25% del colorante Cristal Violeta y en cuantificar, en un lector espectrofotométrico de multiplacas, la densidad óptica (o absorbancia) del Cristal Violeta solubilizado. Este método, al medir la masa celular total y seguir la Ley de Beer – la absorbancia es directamente proporcional al número de células en el pocillo – nos permite valorar de forma global la proliferación celular, así como también los fenómenos de adhesión y desadhesión celular bajo distintas condiciones experimentales.

**material:**

- Placa de cultivo celular (**Placa 1**) de 24 pocillos de la sesión anterior.
- Solución de fijación.
- Solución de Cristal Violeta 0,25% (filtrada)
- Solución de ácido acético glacial al 33%.
- PBS 100 mM
- Pipetas Automáticas
- Pipetas Pasteur

Obs: La solución de fijación está compuesta de paraformaldehído al 2% + 1% de sacarosa en tampón fosfato 100 mM.

**procedimiento:**

1. *Sobre la poyata*: se aspira el medio de cultivo de los pocillos de la **PLACA 1** con la ayuda de una pipeta automática.
2. Se lava rápidamente con 0,5 ml de PBS 100 mM (X2).
3. Se incuba con 0,2 ml de la solución de fijación durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retira la solución de fijación y se deposita en el *recipiente de residuos* correspondiente.
5. Se lava rápidamente por inmersión, en una palangana, con agua del grifo (X2).
6. Se incuba con 300  $\mu$ l de la solución de Cristal Violeta al 0,25% durante 20 minutos.
7. Se retira la solución de tinción.
8. Se lava rápidamente por inmersión, en una palangana, con agua del grifo (X3).
9. Se seca bien con la ayuda de papel de celulosa.
10. Se deja durante 15 minutos en la estufa a 37°C con la tapa abierta.

**a) Recuento celular**

11. Con la ayuda de un microscopio de campo claro y mediante el objetivo de 10X, se cuenta el número de células observadas en cada campo.
12. Se eligen 3 campos distintos (al azar) para cada uno de los pocillos del experimento (diferentes situaciones estudiadas en duplicado).
13. Se registra el recuento. Posteriormente, se establecerá una media aritmética con sus respectivas desviaciones estándares para cada una de las situaciones.
14. Una vez concluido el recuento, se realizan los puntos 15, 16, y 17 del protocolo.

**b) Lectura de la densidad óptica (DO)**

15. Con las placas ya secas, se incuba con 300  $\mu$ l de la solución de ácido acético glacial al 33%, durante 5 minutos. Se recomienda la agitación de la placa.
16. Lectura de la placa mediante un lector espectrofotométrico con filtro de 590 nm (*ver esquema de lectura abajo*)
17. Se registra los resultados de lectura obtenidos

*Correlación entre contaje celular y lectura de la densidad óptica (DO)***Contaje celular**

Pocillos	A1 – A2	B1 – B2	C1 – C2	D1 – D2	A5 – A6	B5 – B6
<b>MD</b>						
<b>SD</b>						

MD: media aritmética; SD: desviación estándar

**Lectura de la DO - CVDE**

Pocillos	A1 – A2	B1 – B2	C1 – C2	D1 – D2	A5 – A6	B5 – B6
<b>MD</b>						
<b>SD</b>						

MD: media aritmética; SD: desviación estándar  
DO: Densidad Óptica a 590 nm.

*Cálculo de la Tasa de Proliferación (TP):*

$$TP = DO \text{ problema} \times 100 / DO \text{ control} = (\% \text{ sobre el control})$$

\* Práctica en grupo (4 personas)

**B. Ensayo de Citotoxicidad mediante la técnica del WST-1.**

**Introducción:** La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) nos permite medir de una forma directa la viabilidad celular frente a diferentes estímulos químicos (citotoxicidad) y físicos (fototoxicidad). También nos permite, pero de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium (WST-1) a sales de formazan, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica es sensible, rápida y sencilla cuando la comparamos con otras técnicas de medida de la proliferación celular – incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina o 5'-bromo deoxiuridina (BrdU) en el ADN nuclear – u otras técnicas de citotoxicidad como el MTT, y sus variantes el XTT o el MTS.

*material:*

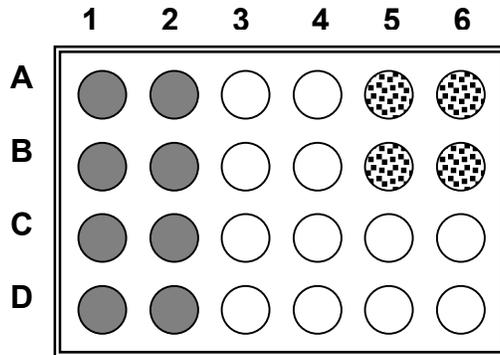
- Placa de cultivo celular (**Placa 2**) de 24 pocillos de la sesión anterior
- Reactivo WST-1 (Sales de Tetrazolium)
- Solución de la molécula problema Z
- Pipetas Automáticas
- Puntas amarillas estériles

**procedimiento:**

1. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad (puntas amarillas estériles), se aplica **20 µl de la molécula problema Z en los pocillos correspondientes** de la **PLACA 2** del experimento de citotoxicidad (ver *llave* correspondiente al esquema del experimento **Placa 2**).
2. Se homogeniza el medio celular de la placa con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pueda obtener una *mezcla regular de la molécula* en el medio de cultivo. (MUY IMPORTANTE)
3. Se incuba en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante 30 minutos.
4. En la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad (puntas amarillas estériles), se aplica **25 µl del reactivo WST-1 en cada uno de los pocillos** de la **PLACA 2** del experimento de citotoxicidad celular.
5. Se homogeniza el medio celular de la placa con movimientos rotatorios suaves a fin de que se pueda obtener una *mezcla regular del reactivo WST-1* en el medio de cultivo. (MUY IMPORTANTE)
6. Se vuelve a incubar en la estufa de cultivos celulares (5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, 90% humedad, 37°C) durante 3:30 horas.
7. Lectura de la placa mediante un lector epectrofotométrico con filtro de 450 nm (*ver esquema de lectura abajo*)
8. Se registra los resultados de lectura obtenidos

Esquema del experimento:

**Placa 2: Ensayo de Citotoxicidad**



{ B5, B6: se añade directamente 20  $\mu$ l / pocillo de la molécula problema Z  
 { D1, D2: se añade directamente 20  $\mu$ l / pocillo de la molécula problema Z

**Obs:** (Ensayo de Citotoxicidad). En los ensayos de tipo colorimétricos es muy importante que los volúmenes finales en cada uno de los pocillos sean los más ajustados posibles. Así, para la mejor interpretación de los resultados de lectura que se obtendrán, se recomienda añadir 20  $\mu$ l / pocillo del medio de cultivo celular atemperado en los pocillos restantes (A1, A2, A5, A6, B1, B2, C1 y C2).

**Lectura de la DO – WST-1**

Pocillos	A1 – A2	B1 – B2	C1 – C2	D1 – D2	A5 – A6	B5 – B6
<b>MD</b>						
<b>SD</b>						

MD: media aritmética; SD: desviación estándar

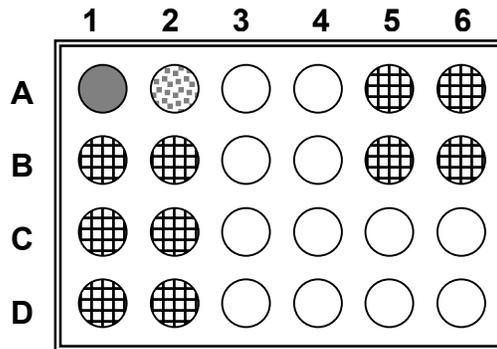
DO: Densidad Óptica a 450 nm.

Esquema para lectura de las **PLACA 1 (CVDE)** y **PLACA 2 (WST-1)**:

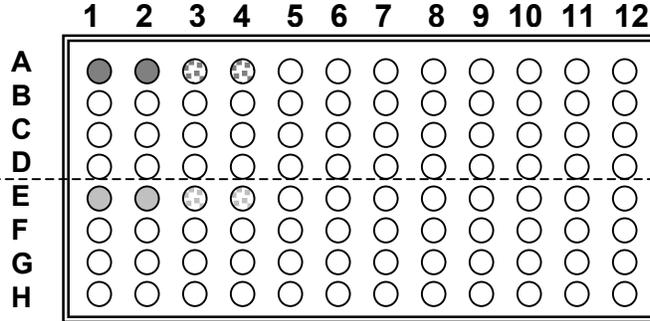
**procedimiento:**

1. *Sobre la poyata:* se pasa 0,1 ml (100 µl) del medio de cultivo del pocillo de la placa de 24 pocillos (volumen total = 0,3 ml) donde se ha realizado el experimento, para una placa de 96 pocillos según el esquema abajo. Se recomienda utilizar puntas amarillas distintas para cada una de las situaciones del experimento.
2. Se lee en el lector espectrofotométrico con la longitud de onda recomendada (CVDE: 590 nm; WST-1: 450 nm)

**PLACA 1:  
CVDE**

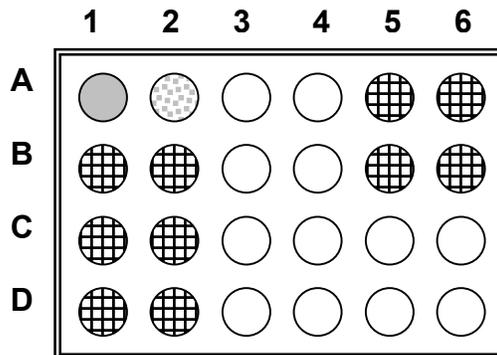


**PLACA 1:  
CVDE**



**PLACA 2:  
WST-1**

**PLACA 2:  
WST-1**



### Recomendaciones (Sesión 4)

1. Solución fijadora: Se aconseja antes de iniciarse la sesión, colocar la solución fijadora en el baño a 37°C. **NO DEJAR LA SOLUCIÓN FIJADORA DENTRO DE LA NEVERA A 4°C.** El profesor podrá dividir la solución fijadora en 4 alícuotas de 3 ml (tubos de tapón verde) y repartir 1 alícuota para cada subgrupo de 4 alumnos. Las placas se fijan a la temperatura ambiente dentro de la cabina extractora de gases. Se deposita las soluciones fijadoras en la botella de residuos (etiquetada PF) que esta dentro de la cabina extractora de gases.

2. Molécula Z : El profesor prepara 4 eppendorfs estériles con 100 µl de la solución y reparte 1 eppendorf para cada subgrupo de 4 alumnos.

3. Se puede suministrar las soluciones de Cristal Violeta 0,25% y la del ácido acético 33% en tubos de tapón verde (Vol = 5 ml) con 4 ml de las respectivas soluciones.

4. Se recomienda reciclar las placas de 96 pocillos tras las lecturas. Las placas de 96 pocillos sirven solamente para la lectura en el Lector Espectrofotométrico que no acepta el modelo de placas de 24 pocillos.. Tras las lecturas los alumnos deben lavar de manera abundante las placas con agua del grifo y posteriormente con agua destilada y se deja secar.

5. Para el recuento celular – *Correlación entre el contaje celular y lectura de la densidad óptica (DO)* – (procedimiento 4A, página 36-37), se puede utilizar los 3 microscopios invertidos con contraste de fases disponibles en el laboratorio. Se recomienda realizar las lecturas con los objetivos de 20X (densidades bajas) o 40X (densidades altas). El recuento se hace en 3 campos distintos seleccionados al azar, del mismo pocillo.

6. El lector de ELISA BioRad 450 (fondo del Lab) es de muy fácil manipulación. Las instrucciones para su correcta utilización se encuentran colgadas (en forma de protocolo) sobre dicho aparato. La maniobra más difícil es la de cambiar el filtro para cada uno de los experimentos. Como proceder se explica debidamente en el protocolo de utilización.

\* técnica del cristal violeta (crecimiento celular): filtro de 595 nm

\* técnica del WST-1 (citotoxicidad): filtro de 450 nm

7. Se recuerda realizar las medidas de área relacionadas al experimento de cicatrización *in vitro*.

#### **Cuestionario 4**

1. ¿Cuál es el principio y la base de la técnica del *Cristal Violet Dye Elutiuon* (CVDE) como ensayo de proliferación y crecimiento celular *in vitro*?
2. ¿Cuál es el principio y la base de la técnica de citotoxicidad celular mediante la utilización del reactivo WST-1 (sales de tetrazolium)?
3. ¿Por qué se observa el cambio de coloración del medio de cultivo en el ensayo de citotoxicidad celular con sales de tetrazolium?
4. ¿Por qué es de mucha importancia que exista una siembra celular homogénea y regular sobre los pocillos de la placa cuando realizamos ensayos del tipo CVDE? Razonar la respuesta.
5. ¿Cuál es el la finalidad de la utilización de soluciones de SDS y NaCl en los ensayos de citotoxicidad? ¿Se podrían sustituir por otras moléculas? Razonar la respuesta.
6. En el caso de que no dispusiésemos de un lector ELISA, para la valoración de los resultados de ambas técnicas realizadas, ¿se podría sustituir por algún otro recurso de medición?
7. En los ensayos de CVDE y el de citotoxicidad mediante WST-1, ¿cuál es la función de los pocillos A1 y A2 en el experimento?

**PRÁCTICA 5: Aplicaciones informáticas en Biología Celular.**

**Objetivo:** Introducción a algunos de los recursos básicos informáticos de utilidad en Biología Celular. Recomendaciones básicas para la elaboración de un informe de experimento. Discusión de los resultados obtenidos y aclaraciones de dudas sobre las técnicas utilizadas en las sesiones. Utilización de los recursos informáticos para la organización de datos, estadística básica y realización de gráficas.

1. Cuestionarios de Prácticas: resolución y discusión de las dudas originadas de los cuestionarios de las respectivas sesiones prácticas.
2. Discusión y exposición de los resultados obtenidos por los grupos en las respectivas sesiones prácticas. Discusión general sobre los resultados, técnicas y métodos utilizados.
3. Elaboración del Informe de Prácticas.

Cada grupo de alumnos deberá elaborar un informe simplificado con los datos obtenidos de la actividad práctica realizada, intentando correlacionar los resultados inmunocitoquímicos, de citotoxicidad, crecimiento celular (densidad óptica y contaje), tasa de proliferación observada y los resultados obtenidos en el ensayo de cicatrización *in vitro*.

Mediante los recursos informáticos de la aula (hoja de cálculos, etc) se deberán elaborar las gráficas representativas de los resultados obtenidos asociados con estadística descriptiva sencilla (medias y desviaciones) sobre las lecturas ópticas, el recuento celular obtenido y las medidas de área realizadas.

Los grupos deberán entregar los informes, como *evaluación de la actividad práctica*, a sus respectivos profesores de prácticas, al término de la misma sesión o en un plazo a concretar con el profesor de prácticas tras haber terminado las actividades.

Existen diversos modelos para la elaboración y la presentación de un informe de resultados de una actividad de laboratorio. El objetivo de esta sesión es el de resumir y sintetizar la actividad desarrollada a lo largo de la semana. Con la elaboración de un informe final de actividades se discutirán los experimentos y aproximaciones realizadas con los resultados obtenidos y sus respectivas conclusiones. A seguir, se propone un modelo simplificado para la elaboración del referido informe. Asimismo, dejamos a título de orientación un modelo de informe más completo (ver recuadro) que normalmente se utiliza en las investigaciones financiadas con proyectos públicos y en la industria farmacéutica, de biotecnología, etc.

Al final de esta sesión se podrá encontrar una tabla donde se observan algunos resultados de tipo estándares (resultados *patrón óptimo*) para los diferentes experimentos realizados en las sesiones de práctica. El objetivo de dicha tabla es únicamente comparativo con los resultados obtenidos por el grupo.

## EJEMPLO DE INFORME PARA LAS SESIONES PRÁCTICAS

*página 1:*

PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA CELULAR 2005-2006

GRUPO K2

Profesor Teoría: Dr. J.V. Van Efenterre (M7)

Fecha: 25 de Septiembre de 2005.

Componentes:

María J. Aldrich

Julio A. Martínez

Carla H. Souza

Andrés D.J. Puch

*página 2:*

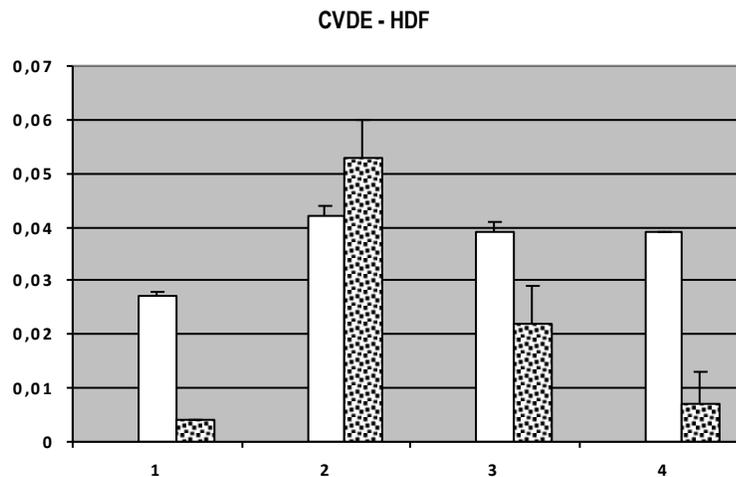


Figura 1: Crecimiento de las células NRK mediante CVDE tras incubaciones con las soluciones 1 a 4.

El ensayo de crecimiento celular mediante la técnica del CVDE (Figura 1) mostró que la solución 2 induce crecimiento de las células NRK tras 24 horas de incubación. Asimismo, hubo un estímulo positivo para el crecimiento celular con las soluciones 3 y 4 cuando comparadas con la solución control (solución 1).

*página 3:*

### CONCLUSIONES

1. Las células NRK presentaran un mayor crecimiento en presencia de la solución 2 (medio de cultivo + FCS 5%) etc.

Ejemplo orientativo para la elaboración de un informe:

- a. *Carátula* (1ª página): hoja de identificación, título y fechas.
- b. *Resumen* (100 palabras máximo): donde constará la idea general del informe y sus resultados y conclusiones principales.
- c. *Palabras clave*: se citan 5 palabras claves que resuman el contenido principal del informe.
- d. *Introducción y Antecedentes*: se presenta una exposición resumida sobre el tema de enfoque elegido por el grupo y los antecedentes que llevarán al objetivo de la investigación realizada.
- e. *Materiales y Métodos*: se explica de forma más o menos detallada, con una secuencia coherente, los materiales (tipo celular, anticuerpos, etc) y los métodos (CVDE, inmunocitoquímica, WST-1, tratamiento estadístico, etc.) utilizados.
- f. *Resultados*: descripción de los principales resultados obtenidos de forma lógica y ordenada. Se recomienda la utilización de tablas remisivas y gráficas para ilustrar la exposición de los resultados observados.
- g. *Discusión*: se realiza con base a los resultados obtenidos, los puntos relevantes del tema de la investigación y las posibles interpretaciones de los hallazgos.
- h. *Conclusiones*: se enumeran las conclusiones principales de la investigación de forma clara y puntual.
- i. *Bibliografía*: se citan las referencias bibliográficas actuales y relevantes sobre el tema de la investigación y la metodología más importante que se ha utilizado.

## Resultados Patrón esperados de los diferentes experimentos

### Lecturas de DO (450 nm) para los Ensayos de Citotoxicidad con WST-1

	control	SDS	NaCl	Molécula Z	control 2	Molécula Z
	0,683		0,213	0,582	0,586	0,864
	0,671		0,196	0,546	0,574	0,874
	0,689		0,218	0,551	0,568	0,872
	0,685		0,231	0,561	0,582	0,859
<b>MD</b>	<b>0,682</b>		<b>0,215</b>	<b>0,560</b>	<b>0,578</b>	<b>0,867</b>
<b>SD</b>	<b>0,008</b>		<b>0,014</b>	<b>0,016</b>	<b>0,008</b>	<b>0,007</b>

control: DMEN con 10% FCS (medio de crecimiento celular)

Molécula Z: Citocalasina 0,2  $\mu$ M

### Contaje celular (cristal violeta 0,2%), Ensayo de Crecimiento

	A1-A2	B1-B2	C1-C2	D1-D2	A5-A6	B5-B6
	control	Solución 1	Solución 2	Solución 3	control 2	Solución P
	36	24	30	40	39	29
	38	23	28	41	37	28
	40	20	27	44	36	31
<b>MD</b>	<b>38,00</b>	<b>22,33</b>	<b>28,33</b>	<b>41,67</b>	<b>37,33</b>	<b>29,33</b>
<b>SD</b>	<b>2,00</b>	<b>2,08</b>	<b>1,53</b>	<b>2,08</b>	<b>1,53</b>	<b>1,53</b>

control: DMEN con 10% FCS (medio de crecimiento)

Solución 1: DMEN sin FCS

Solución 2: DMEN con 5% FCS

Solución 3: DMEN con 20% FCS

Solución P: DMEN con 5% FCS de concentración final

### Lecturas de DO (590 nm) para los Ensayos de Crecimiento con CVDE

	A1-A2	B1-B2	C1-C2	D1-D2	A5-A6	B5-B6
	control	Solución 1	Solución 2	Solución 3	control 2	Solución P
	0,185	0,112	0,148	0,193	0,231	0,178
	0,179	0,116	0,152	0,198	0,229	0,172
	0,189	0,099	0,157	0,201	0,226	0,168
	0,194	0,109	0,153	0,199	0,227	0,17
<b>MD</b>	<b>0,187</b>	<b>0,109</b>	<b>0,153</b>	<b>0,198</b>	<b>0,228</b>	<b>0,172</b>
<b>SD</b>	<b>0,006</b>	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>

control: DMEN con 10% FCS (medio de crecimiento)

Solución 1: DMEN sin FCS

Solución 2: DMEN con 5% FCS

Solución 3: DMEN con 20% FCS

Solución P: DMEN con 5% FCS de concentración final

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

Celis JE (1998). Cell Biology. A Laboratory Handbook. Harcourt Publishers Ltd, UK.

Durfort M, Vilaró S, Renau J, Serratosa J (1991). Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopía Electrónica. Publicacions de la Universitat de Barcelona, Barcelona.

Freshney RI (1999). Culture of Animal Cells. John Wiley and Sons Ltd, UK.

Freshney RI (1999). Freshney's Culture of Animal Cells: A multimedia guide. Wiley-Liss Corp, New York.

Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159:109-113.

Kaufman PB and Wu W (1995). Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Larsson I (1988). Immunocytochemistry: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, Florida.

### *Recursos en Internet:*

Reina M et al. (2005). Prácticas de Biología Celular.  
<http://www.ub.es/biocel/wbc>

Cell Biology Links  
<http://www.museum.state.il.us>

Course of Cell Biology  
<http://lent.med.umn.edu/~mwd/cell.htm>

Virtual Library in Cell Biology  
[http://www.vlib.org/Science/Cell\\_Biology/index.shtml](http://www.vlib.org/Science/Cell_Biology/index.shtml)

Métodos alternativos in vitro (John's Hopkins Center)  
<http://caat.jhsph.edu/about-us/about-us.htm>

Métodos Alternativos in vitro (Invittox)  
<http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/>

Métodos Alternativos in vitro (Altweb)  
<http://altweb.jhsph.edu/>

## HOJA DE ASISTENCIA – PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA CELULAR 2005-2006

**APELLIDOS:****NOMBRE:****GRUPO DE TEORÍA:****Profesor/a:****GRUPO DE PRÁCTICA:****Profesor/a:****FECHA:****CONTROL DE ASISTENCIA**

<b>PRÁCTICA</b>	<b>FECHA</b>	<b>FIRMA ALUMNO</b>	<b>FIRMA PROFESOR</b>
SESIÓN 1			
SESIÓN 2			
SESIÓN 3			
SESIÓN 4			
SESIÓN 5			

*Obs: Esta hoja de asistencia se entregará en el día del examen final de la asignatura.*