



TÍTULO: Iniciación al Cultivo Celular: Obtención y desarrollo de un cultivo de neuronas embrionarias *in vitro*.

PROFESOR RESPONSABLE: Antonio Jesús Martínez Fuentes

MACROÁREA DE CONOCIMIENTO: Biología Celular

RESUMEN: (200 palabras)

Mediante la presente solicitud se pretende que el alumnado conozca los requerimientos, métodos y aplicaciones de la experimentación con cultivos de células eucariotas como una de las técnicas básicas de investigación de uso habitual en diferentes disciplinas científicas.

El término genérico cultivo celular hace referencia al aislamiento o extracción de células, tejidos u órganos y su subsiguiente emplazamiento en un medio ambiente controlado con objeto de permitir su crecimiento. Este medio ambiente consiste generalmente en diferentes soportes plásticos o de vidrio que contienen un líquido (medio de cultivo) que suministra los nutrientes esenciales para la supervivencia y crecimiento.

Mediante la realización de este proyecto pretendemos obtener una población de células neuronales a partir de los hemisferios cerebrales de un embrión de pollo (*Gallus domesticus*) mediante la disociación enzimática y mecánica de los mismos, garantizando su supervivencia (test de viabilidad) y evitando la posible contaminación con microorganismos oportunistas (bacterias, hongos, etc.). Ello se consigue en condiciones de esterilización y en un entorno adecuado que permita el mantenimiento de sus propiedades fisiológicas, metabólicas y genéticas.

Inicialmente el alumnado se familiarizará con los requerimientos necesarios, los diferentes métodos de preparación y esterilización del material que posteriormente usará durante la obtención del cultivo primario. En conjunto, se realizarán diferentes determinaciones técnicamente muy sencillas que no requieren la adquisición de habilidades o competencias previas como extracción del embrión de pollo del huevo, determinación y conteo de la viabilidad celular y observación al microscopio óptico invertido.



PROFESORES PARTICIPANTES:

NOMBRE: María Emilia Alors Pérez
CARGO: Estudiante Predoctoral
DEPARTAMENTO: Biología Celular, Fisiología e Inmunología
FACULTAD: Ciencias
CONTACTO (correo y teléfono): b12alpee@uco.es

OBJETIVOS: (General y específicos)

- Familiarización con los requerimientos, métodos de preparación y esterilización de material de uso en cultivos celulares.
- Establecimiento de un cultivo primario y realización de un subcultivo.

RECURSOS: (Aulas, laboratorios, equipamiento)

Laboratorio de Prácticas de Cultivos del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología equipado con Cámara de Flujo laminar, centrífuga, microscopio invertido, estufa 37 C, pipetas, baño termostatzado, juegos de pipetas, etc.

DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD: (Máximo 5 hojas)

Cronograma detallado de la actividad

Primera sesión

Presentación del proyecto por parte de los Profesores responsables del proyecto.

Segunda sesión

Lugar: Laboratorio de Cultivos del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología situado en el sótano del Edificio Severo Ochoa (C-6) del Campus de Rabanales

Objetivos: Familiarización con el entorno de un Cultivo Celular.

Recursos y consumibles necesarios: material de vidrio, material de plástico (eppendorf, puntas de pipeta, pipetas Pasteur, etc.), medios de cultivo, suero fetal bovino, etc.

Actividades que desarrollar:

El alumnado recibirá una introducción teórica básica sobre diferentes aspectos a tener en cuenta en la realización de un cultivos celular (técnicas de esterilización, equipamiento, entorno, etc.). A continuación se visitarán las instalaciones del Departamento (Sala Blanca) y se mostrará el equipamiento básico de un laboratorio de cultivos. Para finalizar la primera jornada, el alumnado procederá con la preparación del material necesario para la obtención de



un cultivo primario que usará en las siguientes jornadas así como también se familiarizará con los diferentes métodos de esterilización.

Tercera sesión

Lugar: Laboratorio de Cultivos del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología situado en el sótano del Edificio Severo Ochoa (C-6) del Campus de Rabanales

Objetivos: Obtención de un cultivo primario a partir de hemisferios cerebrales de un embrión de pollo e iniciación al recuento celular mediante cámara de Neubauer.

Recursos y consumibles necesarios: puntas de pipeta, pipetas Pasteur desechables, poli-L-lisina, Suero fetal bovino, medio de cultivo RPMI-1640, solución de Hank, solución de Tripsina-EDTA, embriones de pollo de siete días (1 embrión/alumno-a), azul tripán, etc.

Actividades que desarrollar:

Durante el desarrollo de esta sesión se realizara un cultivo primario de hemisferios cerebrales de embrión de pollo. Los hemisferios cerebrales se disociarán enzimática y mecánicamente hasta conseguir una suspensión celular para finalmente proceder a su recuento.

Para ello, el alumnado deberá:

1. Revestir las placas de cultivo con un polímero sintético.
2. Extraer los embriones de pollo y realizar la disección de los hemisferios cerebrales.
3. Obtener una suspensión celular de este material, proceder al recuento celular y realizar un cultivo primario.

Cuarta sesión

Lugar: Laboratorio de Cultivos del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología situado en el sótano del Edificio Severo Ochoa (C-6) del Campus de Rabanales

Objetivos: Observación del Cultivo Primario y realización de un subcultivo.

Recursos y consumibles necesarios: puntas de pipeta, pipetas Pasteur desechables, Suero fetal bovino, medio de cultivo RPMI-1640, solución de Hank, solución de Tripsina-EDTA, azul tripán, etc.

Actividades a desarrollar:

En primer lugar se recogerán las placas de cultivo del incubador de CO₂, pasadas 24 horas de su siembra, y se observará el color del medio de cultivo, densidad y aspecto macroscópico como método básico para determinar posibles contaminaciones microbianas.



Se observará el cultivo al microscopio invertido y se harán las anotaciones y dibujos correspondientes en el cuaderno de laboratorio.

Se identificarán los tipos celulares adherentes (fibroblastos y glía) distinguiéndolos de las neuronas según sus características morfológicas. Se observarán las células en suspensión y la presencia de agregados y otras formaciones que deberán ser interpretadas con las explicaciones del profesorado.

Se procederá al lavado del cultivo y al levantamiento de las células adherentes para realizar el subcultivo, el recuento y el test de viabilidad. Para el subcultivo, las células se incubarán en presencia de tripsina y seguidamente se lavarán con solución de Hank por centrifugación.

Una alícuota de la suspensión celular resultante se aplicará sobre la cámara de Neubauer y servirá para determinar (ver siguiente apartado), mediante su observación al microscopio, los siguientes parámetros:

- el porcentaje de células vivas o viabilidad mediante el test de azul tripán y
- el número de células viables o totales de la suspensión celular.

Quinta sesión

Los alumnos participarán primero en una sesión específica en las que se les enseñará a tratar, analizar y presentar los resultados obtenidos de acuerdo con el método científico. Posteriormente, en formato powerpoint, los alumnos presentarán al resto de participantes los resultados obtenidos en su trabajo, comentando sus impresiones sobre la experiencia desarrollada.

Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
P L A N	Inauguración campus Presentación Proyectos	Preparación del material necesario y familiarización con diferentes métodos de esterilización	1- Revestimiento de las placas de cultivo. 2-Extracción de los embriones y disección de los hemisferios cerebrales. 3-Obtención de una suspensión celular, proceder al recuento celular y realizar un cultivo primario.	1- Observación e identificación de los tipos celulares presentes en el Cultivo Primario. 2- Levantamiento de Células adherentes. 3- Recuento del número y viabilidad celular.	Trabajo en aula convencional y/o de informática
O B J E T O	Organización de los grupos de trabajo	Introducción al cultivo Celular y Visita de una Sala Blanca	Realización de un Cultivo Primario	Observación del cultivo y Realización de un subcultivo	Aprender a tratar, analizar y presentar los resultados



REFERENCIAS: Técnicas de Histología y Biología Celular (Editorial Elsevier-Masson) Luis Montuenga, Francisco J Esteban y Alfonso Calvo, 2009 y Basic Cell Culture: A practical Approach. Davis, J.M. 2ª ed., Oxford Univ. Press. 2006.