



Biología Celular y Molecular

Guía de TP Nro. 1

Cultivo primario de embrión de pollo

Introducción

El cultivo de células generado a partir de material tomado directamente de un organismo se denomina **cultivo primario**. Las células obtenidas de esta forma son células normales adaptadas al crecimiento *in vitro*.

En la actualidad, el cultivo de células normales es una poderosa herramienta en el estudio de la biología celular y molecular. La ventaja de la utilización de células normales radica en la similitud de éstas a las células presentes en el organismo, a diferencia de las líneas celulares establecidas o continuas que por sus características de inmortalidad tienen comportamientos anómalos. Las células obtenidas de un cultivo primario no son inmortales por lo que el número de divisiones celulares que pueden sufrir en cultivo es limitado y varía dependiendo del origen del cultivo, de las condiciones de cultivo y del tipo celular, entre otras cosas. Las aplicaciones más importantes de cultivos primarios es la producción de vacunas, la propagación de virus, utilizar estas células en sistemas de co-cultivo, análisis de efectos de drogas sobre células normales, entre muchos otros.

Las técnicas de cultivo de células normales utilizan principalmente como materia prima organismos que estén en estadios embrionarios o postnatales tempranos. En este práctico se buscará cultivar diferentes células totales procedentes de un embrión de pollo (tardan 21 días en desarrollarse, por lo tanto se utilizan huevos de 7 días aproximadamente). Se obtendrá por consiguiente una población heterogénea compuesta de distintos tipos celulares. Con el cultivo en marcha se podrán diferenciar distintas morfología celulares acordes al tipo celular de origen: células epiteliales, fibroblastos, miocitos, neuronas, etc.

En este caso se utilizarán embriones de pollo como material de partida por diversas razones: gran disponibilidad de los mismos, son más grandes que los embriones de ratón en esta etapa y es posible disectar algún rudimento de órgano en particular de ser necesario para cultivar un tipo celular específico y dan buen rendimiento de células en cultivos primarios.

Objetivos

Aislar células de tejidos vivos y comenzar un cultivo celular.

Materiales

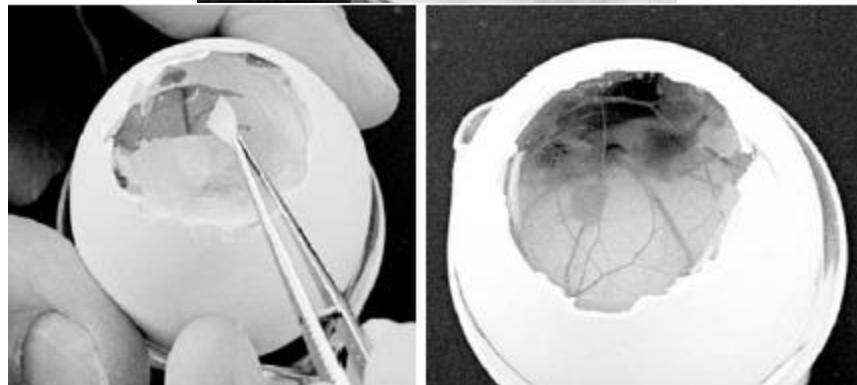
- Huevo embrionado
- Pinzas y tijeras
- Caja de Petri estéril
- PBS estéril
- D-MEM suplementado con Gln
- SFB (Suero Fetal Bovino)
- Tubos estériles y frascos T25 estériles

Desarrollo de la práctica

Los alumnos serán divididos en grupos por cabina de seguridad biológica. A cada grupo se le proveerá de un huevo embrionado en condiciones óptimas para la realización de la práctica.

Protocolo TP1-Día 1:

1. Localizar la cámara de aire en el huevo embrionario.
2. Desinfectar la cascara del huevo con alcohol 70° en la zona de la cámara de aire.
3. Romper la cáscara de lado de la cámara de aire cuidando que no ingresen partes de la cáscara al interior de huevo.



Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, by R. Ian Freshney
Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Inc.

4. Con otro instrumento limpio, romper la membrana coclear y sacar el embrión de forma estéril, tratando de no tocar la yema. Ponerlo en una caja de Petri estéril.
5. Sacrificar inmediatamente al embrión. Descartar la cabeza y quedarse con el cuerpo del embrión.
6. Lavar con PBS estéril al cuerpo del embrión 3 veces.
7. Pasar el material limpio a una caja de Petri estéril, colocar 3 ml de medio de cultivo (MEM) y cortarlo en trozos chicos con una tijera.
8. Colocar el medio de cultivo con los trozos de tejido en un tubo cónico y dejar unos minutos decantar.
9. Tomar el sobrenadante (intentando no tomar los trozos de tejido más grandes) y sembrar un frasco T-25. Completar con medio de cultivo y 10% de SFB, considerando un volumen final de 5 ml.
10. Rotular el frasco.

Las células serán monitoreadas para poder ser observadas al microscopio la próxima clase (TP1-Día 2)

Preguntas para TP1-día 2

1. En que se basó el método de separación de células utilizado en este TP? Conoce otros métodos aplicables? Cuáles?
2. Qué características de adhesión al sustrato debe tener una célula para poder ser observada en el cultivo primario de embrión? En función de esta característica, qué tipos celulares no están representados en este cultivo?
3. Observar el cultivo obtenido y determinar según la forma a que tipo celular podría corresponder la célula observada. Qué tipo celular es el más representado? Cuál sería el motivo?
4. Defina las diferencias entre un cultivo primario, línea celular inmortalizada y línea celular tumoral. Cuál de estos 3 tipos de cultivos presenta células transformadas?
5. Si Ud. a este cultivo primario le cambia el medio de cultivo por MEM+10% SFB fresco. Como rotula ese frasco? Y si en cambio lo repica? Como se rotula ese frasco? Es una línea celular? Por qué?
6. Que ventajas y desventajas tiene trabajar con cultivos primarios vs. líneas celulares establecidas?
7. Cuanto tiempo esperaría poder mantener las células en cultivo? Por qué?