

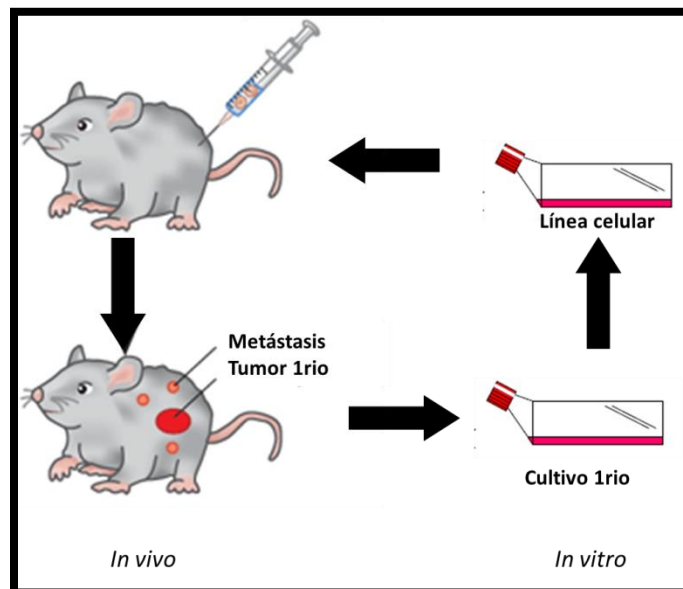
Biología Celular y Molecular

Guía de TP Nro. 6

Cultivo primario de tumor

Introducción

Una de las técnicas utilizadas para mantener una línea tumoral es el pasaje *in vivo* por medio de la inoculación en ratones singénicos. Una de las consideraciones a tener en cuenta es que las zonas de necrosis intratumorales no pueden ser utilizadas para este procedimiento. Es por ello, que tumores mas bien pequeños son los más aptos para realizar este trabajo práctico.



El procedimiento para extraer ese tumor y sembrarlo *in vitro* es relativamente sencillo, la mayor precaución es mantener la pieza tumoral en estrictas condiciones de asepsia. El tumor se extrae en

forma aséptica y se lo traslada al laboratorio en frío o a temperatura ambiente. El procesamiento puede realizarse inmediatamente o bien dentro de las 24 hs., en cuyo caso se guarda la pieza tumoral en heladera a 4°C, cubierta con medio de cultivo. El medio de cultivo empleado para cultivar tumores murinos es: D-MEM, SFB 10% y antibióticos.

Parte 1: Establecer tumores de F3II en el flanco de ratones BALB/c.

Al igual que otras cepas, los ratones BALB/c son endocriados con un mismo (background) fondo genético que los hace especialmente útiles en el trabajo de laboratorio. La inoculación permite el pasaje *in vivo* de células tumorales o tumores originados en la propia cepa.

Objetivo

Establecer un tumor subcutáneo de células F3II en ratones Balb/c.

Materiales

- Reactivos de cultivo para el repique.
- Jeringa de tuberculina 27G
- Ratones Balb/c

Desarrollo de la práctica

Protocolo

1. Realizar un repique tal como se realizó en el TP2 hasta el paso numero 11 inclusive.
2. Realizar una dilución en D-MEM (libre de suero) de la suspensión celular, de forma de obtener 1×10^6 cél/ml.
3. Inocular a los ratones en el espacio subcutáneo del flanco derecho 0.2 ml de la suspensión tumoral (200.000 células por ratón). Para ello se utilizaran jeringas de tuberculina y agujas de 27 G. Para certificar si la inoculación fue exitosa se debe palpar un habón debajo de la piel. A los 7 días debería ser palpable en el subcutis un pequeño tumor similar a un granito de arena.
4. Dejar progresar 3-4 semanas para llevar adelante el cultivo primario.

Parte 2: Cultivo primario de tumor F3II

A partir del tumor establecido en la parte anterior, se llevara a cabo un cultivo primario. Es importante destacar que se debe maximizar las medidas de esterilidad durante el procesamiento y manipulación del material para disminuir al máximo la carga de posibles contaminantes.

Objetivos

Aislar células del tumor de F3II formado en balb/c y comenzar un cultivo celular.

Materiales

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

Protocolo

1. Colocar el tumor dentro de una caja de petri estéril. Limpiar con ayuda de dos bisturíes, eliminando la cápsula de tejido conectivo y las zonas necróticas. Cortar en fragmentos y lavar 2 o más veces con PBS estéril, hasta que el líquido de lavado sea límpido.
2. Agregar 3 ml de D-MEM sobre la pieza tumoral y cortar en trocitos (con tijera de cirugía) la hasta generar fragmentos indivisibles (tipo puré).
3. Colocar el D-MEM con las células tumorales desprendidas en un tubo cónico de 15 ml y dejar decantar las partes más grandes.
4. Sembrar en frasco de 25 cm² con SFB 10% y D-MEM el “sobrenadante” (evitando pedazos grandes de tejido). Incubar en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C.
5. Evaluar el crecimiento de las células tumorales.

Preguntas

- 1- Según los conocimientos adquiridos en esta cursada; cómo denominaría el cultivo celular obtenido en el TP? es igual a la línea celular F3II R54, utilizado para inocular los ratones hace 3 semanas?
- 2- En cuanto a modelos animales, defina que son los:
 - a. MODELOS SINGENICOS
 - b. MODELOS XENOGENICOS
- 3- Espera encontrar un cultivo puro de células tumorales? Por qué?
- 4- Todas las líneas celulares continuas in vitro forman tumores *in vivo*?
- 5- Complete el siguiente cuadro:

Modelos	Ventajas	Desventajas
<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>		