

Taller cultivo celular

Herramientas útiles para la labor diaria

MODULOS

1- Comunicación

2- Uso correcto de equipamiento

3- Esterilización material

4- Medios y suplementos

5- Congelamiento celular/Recuento celular

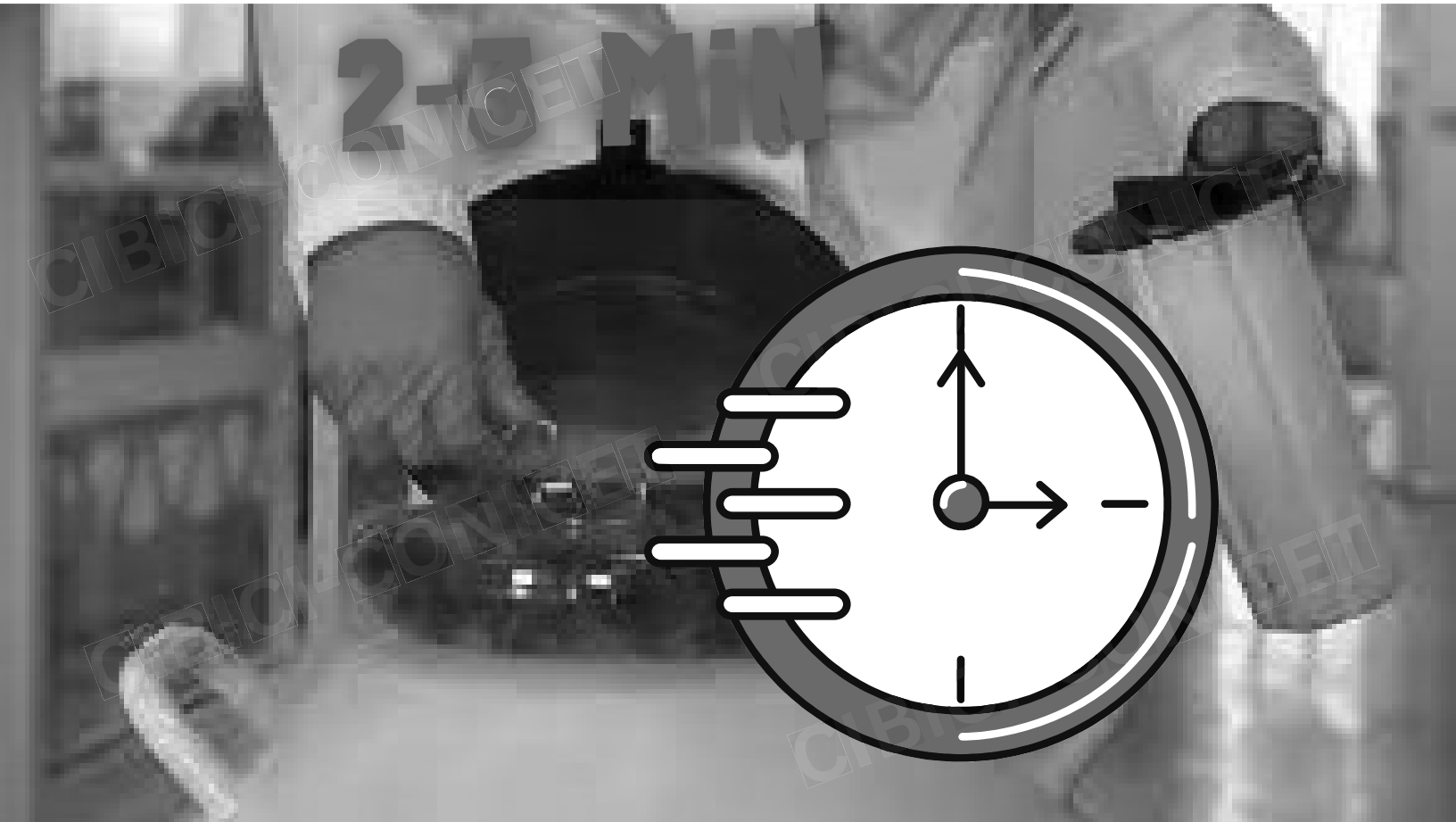
6- Descongelamiento celular

Objetivo

Tomar conocimiento de las distintas herramientas para estandarizar procesos y disminuir los riesgos a los que se exponen los cultivos celulares

Módulo 6: Descongelamiento celular

HERRAMIENTAS UTILES PARA LA LABOR DIARIA



DESCONGELAMIENTO CELULAR

01

Ráido, 1-3 min o hasta que se derritan los cristales de hielo
Descongelar en baño de 37°C

01

Utilizar barbijo y gafas al descongelar ya que hay peligro de explosión del vial

02

Utilice las técnicas asépticas para trabajar en la cabina

02

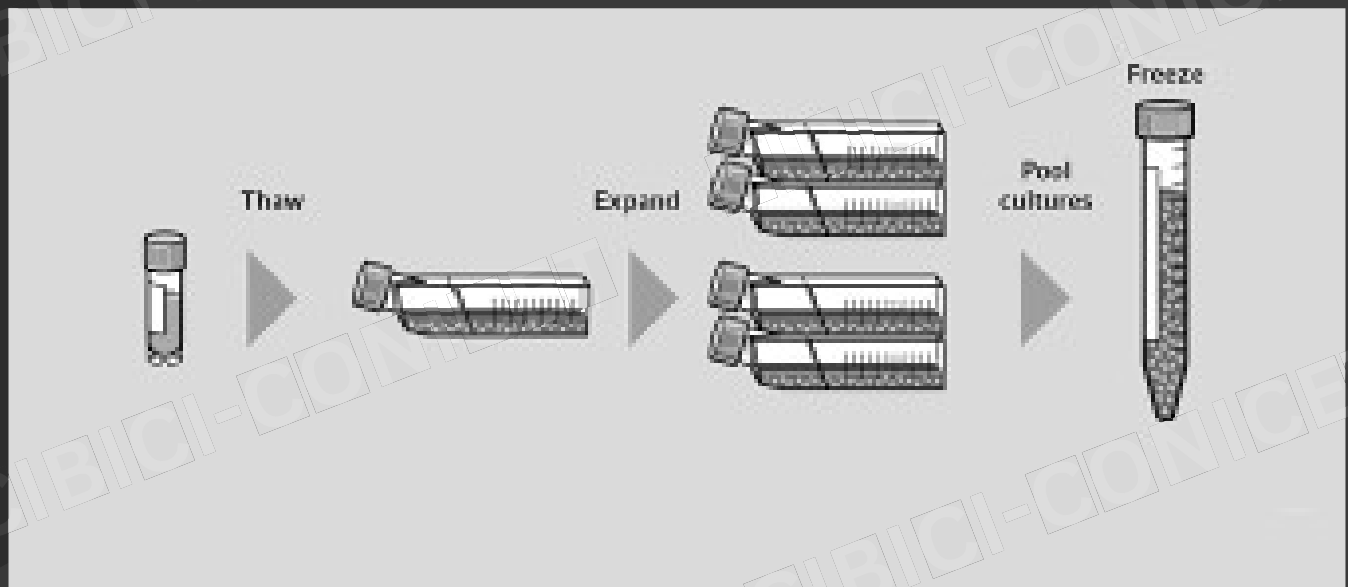
Sacar el criovial, desinfectar rociando con alcohol 70% e introducir en la cabina

03

Remover DMSO o plaquear



DESCONGELAMIENTO CELULAR



Remover DMSO o
No Remover
DMSO...



Factor crítico?
suspensión adherentes volúmen



volúmen de dilución=CF DMSO no toxico 0.5%

NO REMOVER EL DMSO

04

Destapar el vial y transferir el contenido a una placa o flask conteniendo MCC completo previamente atemperado en incubadora.

05

mezclar suavemente.

06

24 h despues chequear el cultivo al MO y expandir si es necesario

Las células en suspensión deben ser diluidas lentamente luego de descongeladas ya que la dilución rápida reduce su viabilidad.

Este proceso gradual es particularmente importante con DMSO, con el cual la dilución repentina puede causar severo daño osmótico y reduce la supervivencia celular a la mitad.

Muchas células no requieren centrifugación, sino que el medio se reemplaza a las 24h y con eso es suficiente para la monocapa y en suspensión.

Sin embargo algunas células (en general las que crecen en suspensión) son más sensibles al crioprotector, particularmente al DMSO, por lo que deben ser centrifugadas luego de descongeladas, y la dilución debe realizarse lentamente en medio de cultivo en primer lugar.

REMOVER EL DMSO

04

Destapar el vial y transferir el contenido a un tubo estéril y centrifugar con 9 ml del MCC.

05

Remover el crioprotector (DMSO) centrifugando 10 min a 125g.

06

Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 1-2 ml de MCC.

07

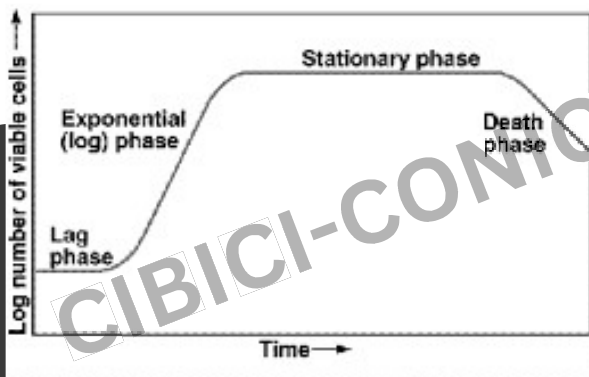
Transferir la suspensión celular a una placa o flask, con MCC completo, mezclar suavemente.

08

24 h después chequear el cultivo al M0 y expandir si es necesario

FASES DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las células crecen y se dividen en monocapas o en suspensión, siguiendo patrones de crecimiento característicos, que cuenta de 4 fases:



-**Lag** (inmediatamente después de plaquearla, crecimiento lento, recuperación del estrés del subcultivo)

-**Log o exponencial** (entra en crecimiento exponencial hasta que se llena el último lugar en la placa o la concentración celular excede la capacidad del medio)

-**Estacionaria o plateau** (proliferación lenta y detención del crecimiento)

IMPORTANTE

Para asegurar:

- la viabilidad
- estabilidad genética
- estabilidad fenotípica

Las líneas celulares deben ser mantenidas en la fase **exponencial**.

Necesitan ser subcultivadas o expandidas de manera regular antes que entren en la fase estacionaria de crecimiento, antes que la monocapa llegue al 100% de confluencia o antes que la suspensión celular alcance el máximo de densidad celular recomendado.

Generar la curva de crecimiento de cada línea celular permite determinar las características de crecimiento de esa línea.

CIBICI-CONICET

CHEQUEO DE PLACAS

CIBICI-CONICET



Observar:

- Morfología y viabilidad de los cultivos de manera regular y cuidadosa.

- Examinar el medio para detectar contaminación microbiana:

Cambio de color del medio por variación de pH (amarillo o violeta)

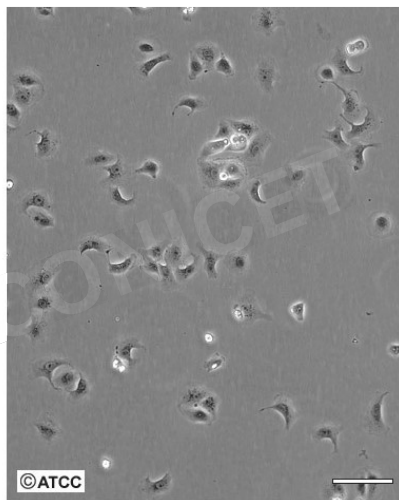
Turbidez

- Presencia de partículas
- Presencia de pequeñas colonias de hongos en la interfase medio-aire.
- Observar los bordes de las placas a simple vista (gotas o chorreado)
- **40x**, chequear el medio para ver si hay evidencia de contaminación microbiana y la morfología de las células.



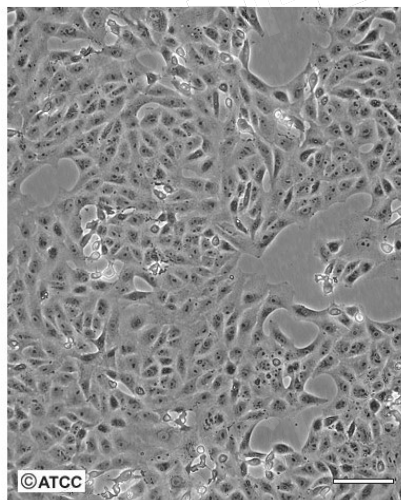
EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



Low Density

Scale Bar = 100µm



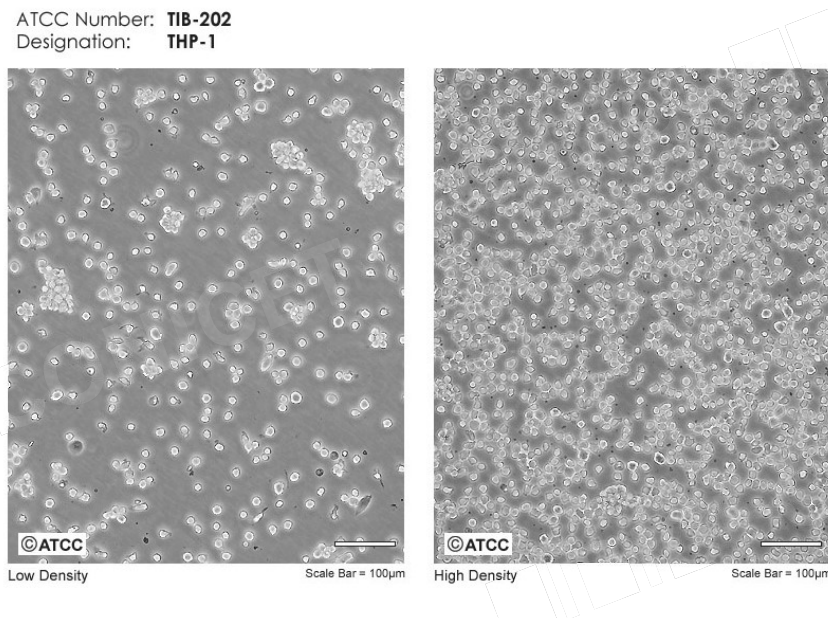
High Density

Scale Bar = 100µm

EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

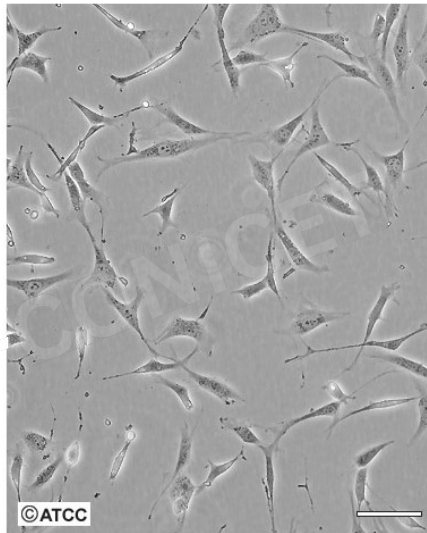


Suspension



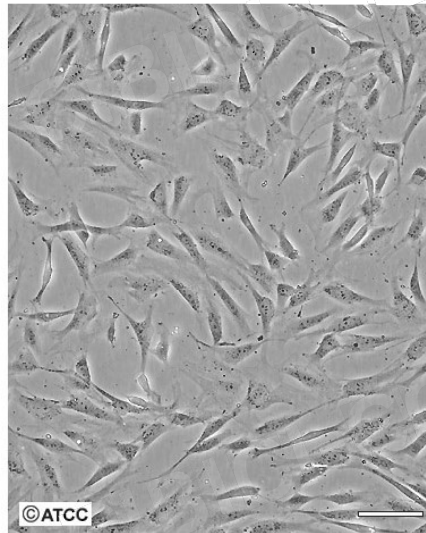
EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

ATCC Number: **CRL-1658**
Designation: **NIH/3T3**



© ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm

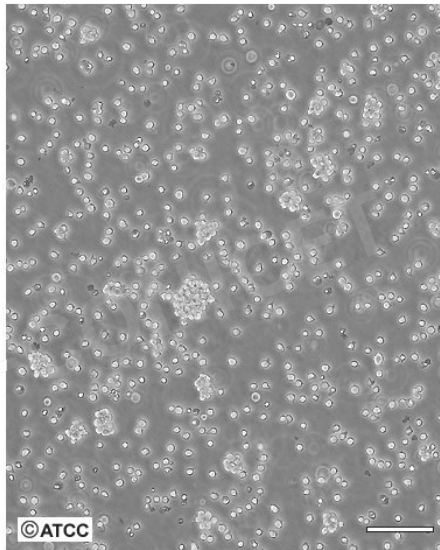


© ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

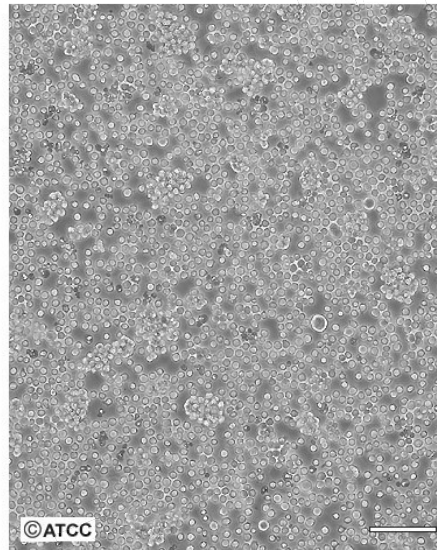
EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

ATCC Number: **TIB-152**
Designation: **Jurkat (Clone E6-1)**



©ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm



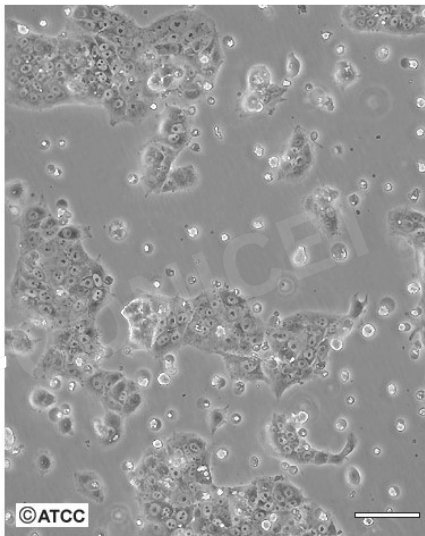
©ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

Suspension

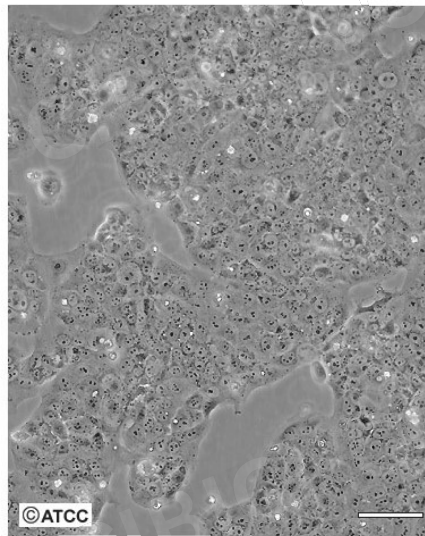
EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

ATCC Number: **HTB-36**
Designation: **JEG-3**



©ATCC
Low Density

Scale Bar = 100µm

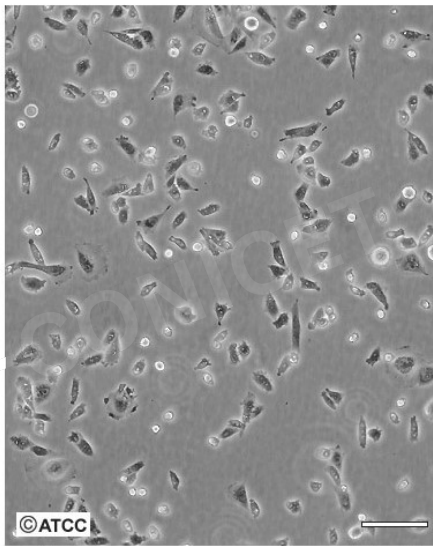


©ATCC
High Density

Scale Bar = 100µm

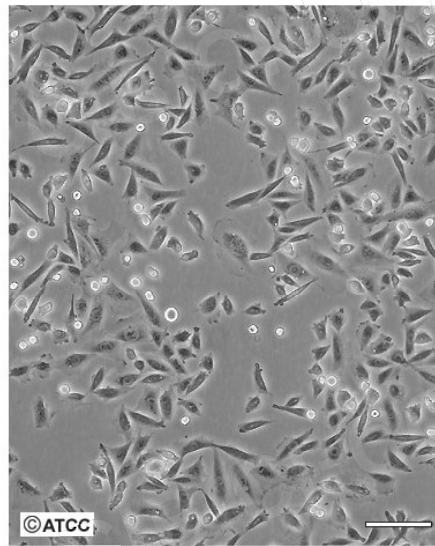
EJEMPLOS DE CRECIMIENTO CELULAR

ATCC Number: **CCL-61**
Designation: **CHO-K1**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm