



**Ministerio de Cultura y Educación**  
**Universidad Nacional de San Luis**  
**Facultad de Química Bioquímica y Farmacia**  
**Departamento: Bioquímica y Cs Biológicas**  
**Area: Morfología**

**(Programa del año 2009)**

### **I - Oferta Académica**

| <b>Materia</b>                                          | <b>Carrera</b>             | <b>Plan</b> | <b>Año</b> | <b>Período</b>  |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|-------------|------------|-----------------|
| (CURSO OPTATIVO I (LBq)) CULTIVO DE CELULAS DE ANIMALES | LIC. EN BIOLOGIA MOLECULAR |             | 2009       | 2° cuatrimestre |

### **II - Equipo Docente**

| <b>Docente</b>     | <b>Función</b>    | <b>Cargo</b> | <b>Dedicación</b> |
|--------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| GOMEZ, NIDIA NOEMI | Prof. Responsable | P.Adj Exc    | 40 Hs             |

### **III - Características del Curso**

| <b>Credito Horario Semanal</b> |                 |                          |                                              |              |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| <b>Teórico/Práctico</b>        | <b>Teóricas</b> | <b>Prácticas de Aula</b> | <b>Práct. de lab/ camp/ Resid/ PIP, etc.</b> | <b>Total</b> |
| Hs                             | 20 Hs           | 10 Hs                    | 30 Hs                                        | 12 Hs        |

| <b>Tipificación</b>                            | <b>Periodo</b>  |
|------------------------------------------------|-----------------|
| B - Teoría con prácticas de aula y laboratorio | 2° Cuatrimestre |

| <b>Duración</b> |              |                            |                          |
|-----------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Desde</b>    | <b>Hasta</b> | <b>Cantidad de Semanas</b> | <b>Cantidad de Horas</b> |
| 16/11/2009      | 18/12/2009   | 5                          | 60                       |

### **IV - Fundamentación**

Los cultivos de células constituyen uno de los campos más fascinantes de la biología. Representan una herramienta para elaborar modelos experimentales y permiten resolver numerosos problemas biológicos. Hoy en día es una técnica ampliamente utilizada tanto en las ciencias básicas, biología celular, biología molecular hasta el campo de la biotecnología que ha tenido una evolución muy rápida. Las aplicaciones son múltiples ya que los cultivos celulares son usados para la evaluación segura de compuestos tales como drogas, cosméticos, aditivos alimenticios, pesticidas y químicos industriales. Existen programas de desarrollo de drogas para la identificación de agentes quimioterapéuticos que involucran una extensa evaluación preclínica para detectar la actividad antineoplásica. Así, el alumno que hace este curso podrá conocer los principios básicos del cultivo de células.

### **V - Objetivos / Resultados de Aprendizaje**

- Entrenar al alumno en las técnicas de esterilización de material específico para cultivos de células.
- Llevar a cabo las principales metodologías para el aislamiento de las células y su posterior cultivo.

### **VI - Contenidos**

#### **PROGRAMA ANALITICO Y/O DE EXAMEN**

Tema 1: Introducción, generalidades. Cultivo primario. Líneas celulares. Medios de cultivo: requerimientos celulares, buffers, sueros, calidad del agua, contaminación. Viabilidad celular. Citotoxicidad.

Tema 2: Separación de células. Centrifugación diferencial. Gradientes discontinuos. Formación de gradientes. Recuento celular. Métodos directos e indirectos. Hemocitómetro. Citometría de flujo. Técnicas de inmunofluorescencia. Análisis de

resultados. Distintas aplicaciones de la citometría de flujo. Turbidimetría. Contenido proteico.

Tema 3: Macrófagos. Poblaciones. Funciones que desempeñan. Aislamiento de macrófagos alveolares. Diferentes formas de obtención de lavados broncoalveolares. Condiciones de recolección de muestras. Importancia de la conservación del material. Diferentes parámetros como índice de injuria.

Tema 4: Hepatocitos. Aislamiento, purificación y caracterización de los tipos celulares hepáticos. Procedimientos de aislamiento. Uso de colagenasa, pronasa, EDTA. Purificación de células parenquimales y no- parenquimales. Separación de células de Kupffer y fracciones de células endoteliales. Caracterización de las fracciones celulares aisladas. Centrifugación con gradiente de densidad usando Percoll.

Tema 5: Aislamiento y cultivo de células de ovario. Regulación endocrina, mecanismos bioquímicos y moleculares. Vías de transducción de señales intracelulares y la expresión génica. Características diferenciales de cultivos de células de la granulosa y de la teca.

## VII - Plan de Trabajos Prácticos

TRABAJOS PRACTICOS DE AULA: SEMINARIOS:

Exposición de seminario, serán entregado con suficiente antelación. El tiempo para cada seminario se estipula entre 30 y 45 minutos.

TRABAJOS PRACTICOS DE LABORATORIO

1-Práctica de esterilización de material de cultivo.

2-Preparación de medios de cultivo y esterilización.

3-Obtención de macrófagos alveolares. Ensayos de viabilidad celular. Recuento e identificación. Tinción de células frescas y cultivadas.

4-Obtención de macrófagos peritoneales de rata. Ensayos de viabilidad celular. Recuento e identificación. Tinción de células frescas y cultivadas.

5-Separación de hepatocitos, cultivo primario y ensayos de viabilidad.

6-Aislamiento y cultivo de células de la granulosa.

7-Comentarios y discusión de resultados.

8-Exposición de seminarios y defensa de los mismos.

## VIII - Regimen de Aprobación

La evaluación se realizará con la sumatoria de los siguientes elementos:

- a) Participación del estudiante durante las sesiones teóricas y prácticas.
- b) Interpretación y exposición de seminarios.
- c) Evaluación final escrita.

## IX - Bibliografía Básica

[1] -Animal cell culture. A practical Approach, 2nd edition. Ed. By R.I. Freshney, 1992.

[2] -Hendriks, HFJ. Isolation, purification and characterization of liver cell types. Methods of enzymology, vol. 190, 1990.

[3] -Seglen, P. Preparation of rat liver cells. Methods Cell Biol, 13: 29, 1976.

[4] -Wang, SR. Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic functions in primary culture. In vitro cellular and Developmental Biology, 21: 526, 1985.

[5] -Dalet C. Use of percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long- term viability. Analytical Biochemistry 122: 119, 1982.

[6] -Bader, A. Use of organotypical cultures of primary hepatocytes to analyse drug transformation in man and animals. Xenobiotica, 24: 623, 1994.

[7] -Faris, R. Isolation, propagation and characterization of rat liver serosal mesothelial cells. American Journal of Pathology, 145: 1432, 1994.

[8] -Hoffmann, B. Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture. Journal of cellular physiology, 139: 654, 1989.

[9] -Bronfman, M. Isolation of intact organelles by differential centrifugation of digitonin- treated hepatocytes using a table eppendorf centrifuge. Analytical Biochemistry, 255:252, 1998.

[10] -Forsell, JH. A technique for isolation of bovine hepatocytes. Journal of animal science, 60:1597, 1985.

- [11] -Auger, M. J., and Ross, J. A. The biology of the macrophage. In "The Natural Immune System. The Macrophage" (Lewis, E., Mc Gee, J. O. D., Eds.), pp. 1-74, IRC, Press, Oxford,1992.
- [12] -Leikauf GD, McDowell SA, Wesselkamper SC, Hardie WD, Leikauf JE, Korfhagen TR, Prows DR. Acute lung injury: functional genomics and genetic susceptibility. Chest ,121(3 Suppl):70S-75S, 2002.
- [13] -Li C, Wright MM, Jackson RM. Reactive species mediated injury of human lung epithelial cells after hypoxia-reoxygenation. Exp Lung Res; 28(5):373-89, 2002.
- [14] -Gomez, N.N., Fernandez, M. R., Zirulnik, F., Gil, E., Scardapane, L., Ojeda, M. S., Gimenez, M.S. Chronic Zinc Deficiency Induces An Antioxidant Adaptive Response in Rat Lung. Experimental Lung Research, vol. 29 (7), 485-502, 2003.
- [15] -Obe G, Beek B. The human leucocyte test system VII. Further investigations concerning micronucleus- derived premature chromosome condensation. Humangenetik 30(2): 143-54, 1975.
- [16] -Preston RJ, Au W, Bender MA, Brewen JG, Carrano AV, Heddle JA, McFee AF, Wolff S, Wassom JS. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: a report of the U.S. EPA's gene-tox program. Mutation Research 87(2):143-88, 1981.

## **X - Bibliografía Complementaria**

## **XI - Resumen de Objetivos**

Esta asignatura tiene como objetivo lograr que el alumno tenga un conocimiento básico de las técnicas de cultivo de células animales y los principales cuidados que requiere esta metodología.

## **XII - Resumen del Programa**

Tema 1: Introducción, generalidades. Cultivo primario. Líneas celulares. Medios de cultivo. Viabilidad celular. Citotoxicidad.

Tema 2: Separación de células. Recuento celular. Hemocitómetro. Citometría de flujo. Técnicas de inmunofluorescencia. Distintas aplicaciones de la citometría de flujo. Turbidimetría.

Tema 3: Aislamiento y cultivo de Macrófagos.

Tema 4: Aislamiento y cultivo de Hepatocitos.

Tema 5: Aislamiento y cultivo de Células de ovario.

## **XIII - Imprevistos**

## **XIV - Otros**