

**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 técnicas de cultivo de células normales utilizan principalmente como materia prima organismos que estén en estadios embrionarios o postnatales tempranos.

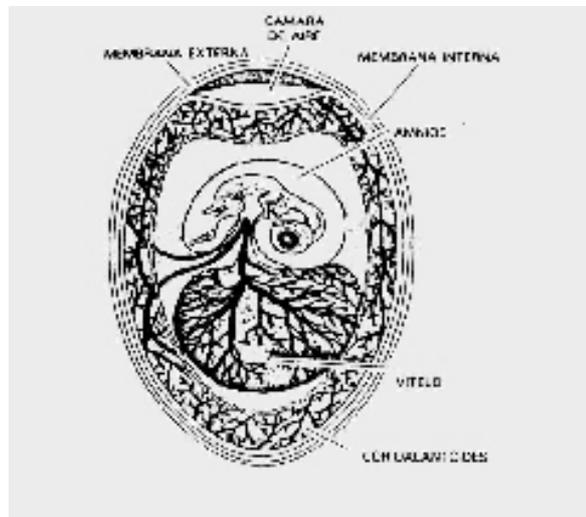
En este práctico se buscará cultivar diferentes células totales procedentes de un embrión de pollo. Se obtendrá por consiguiente una población heterogénea compuesta de distintos tipos celulares. Con el cultivo en marcha se podrán diferenciar distintas morfología celulares acordes al tipo celular de origen: células epiteliales, fibroblastos, miocitos, neuronas, etc.

## Desarrollo de la práctica

Los alumnos serán divididos en cuatro grupos iguales. A cada grupo se le proveerá de un huevo embrionado en condiciones óptimas para la realización de la práctica.

El protocolo a realizarse en la práctica es el siguiente:

- 1) **Observar** el huevo con un ovoscopio para constatar que este vivo. Localizar y marcar sobre la cáscara con un marcador la cámara de aire.
- 2) **Desinfectar** la cascara del huevo con alcohol 70° en la zona de la cámara de aire.
- 3) **Romper y sacar** la cascara de la zona marcada con una pinza.
- 4) Con otro instrumento, **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) **Lavar** con solución fisiológica estéril al embrión.
- 6) **Descartar**, cortando con un bisturí, **vísceras, pico, ojos y patas**. Si es necesario volver a lavar para eliminar todo resto de sangre.

- 7) **Pasar** el material limpio a una caja de Petri estéril y **cortarlo en trozos chicos** con una tijera.
- 8) **Agregar** tripsina pre-calentada a 37°C en un volumen igual a tres veces el volumen estimado del embrión.
- 9) **Transferir** esta solución, usando una pipeta Pasteur de boca ancha, a un Erlenmeyer que contenga un imán estéril.
- 10) **Agitar** usando el agitador electromagnético a 37°C.
- 11) Se van tomando muestras del tripsinizado a distintos tiempos y se observa al microscopio si van apareciendo células libres.
- 12) Cuando hay desprendimiento de abundantes células **se filtra** por un embudo con gasa estéril o por malla metálica. El filtrado se recoge en un tubo de centrifuga con suero para detener la acción de la tripsina.
- 13) **Centrifugar** a 800 - 1000 r.p.m. durante 5 min.
- 14) **Descartar** el sobrenadante y resuspender el pellet con 10 ml de medio de cultivo.
- 15) **Diluir** con el medio de cultivo adecuado adicionando 10 % de suero y **sembrar  $0,5 \times 10^6$  cel/ml**.

Las células serán monitoreadas para que estén en condiciones de ser observadas en el práctico posterior.

## **Ejercicios**

**En qué se basa el método enzimático utilizado para despegar las células?**

**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?**

**Observar el cultivo obtenido y determinar según la forma a que tipo celular podría corresponder la célula observada. Buscar por lo menos tres tipos diferentes de células y hacer un esquema.**

**Qué tipo celular es el más representado? ¿Cuál sería el motivo?**