|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2023-2S |
| **ASIGNATURA** | Biología Molecular | **SEMESTRE:** 6to | **PARALELO:** A |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | Ing. Félix Falconi O. |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | 11 | **FECHA:** | **HORA:** 17:00-20:00 | **DURACIÓN:** 3 |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **NÓMINA** |
| 1. Acosta Cáceres Melany Sarahi
 | 1. Pomagualli Pucha Jomayra Vanesa
 |
| 1. Acosta Tenelema Marcela Carolina
 | 1. Quezada Vega Karen Vanessa
 |
| 1. Amores Garzón Jonathan Israel
 | 1. Quilligana Urrutia Lorena Estefanía
 |
| 1. Ashqui Agualsaca Kerly Graciela
 | 1. Raza Aulla Doménica Salome
 |
| 1. Balladares Hidalgo Micaela Alexandra
 | 1. Reyes Bayas Angie Viviana
 |
| 1. Barragán Lara Patricio Xavier
 | 1. Ríos Palma Heidi Lissette
 |
| 1. Borja Coba Malena Salome
 | 1. Saltos Michilena Anahely Arai
 |
| 1. Caiza Moya Sulay Maricela
 | 1. Samaniego Álvarez Angie Nicole
 |
| 1. Carrasco Chiluisa Escarlet Nicole
 | 1. Silva Villa Cinthya Dayana
 |
| 1. Carvajal Inca Grace Dayana
 | 1. Silva Hidalgo Lizbeth Estefanía
 |
| 1. Castillo Jiménez María Belén
 | 1. Tapia Jacome Priscila Mikaela
 |
| 1. Cedeño Jiménez José Andrés
 | 1. Tarco Tarco Mónica Esperanza
 |
| 1. Espinoza Espinoza Tanya Aracelly
 | 1. Tirado Martínez Wendy Anahi
 |
| 1. Guamán Roldan Tamia Jamilexs
 | 1. Tuapanta Yupa Johanna Estefanía
 |
| 1. Hernández Grijalva Jessica Ana
 | 1. Vaquilema Anilema María Alicia
 |
| 1. Iglesias Vera Axel Alexander
 | 1. Vargas Mites Helens Mailyn
 |
| 1. Inguillay Guagcha Elvis Estiven
 | 1. Vélez Arévalo Talitacum Yolanda
 |
| 1. Noboa Ríos Jessica Lisbed
 | 1. Vizuete Parra Oliver Daniel
 |
| 1. Osorio Quinatoa Allison Nayeli
 | 1. Yucta Concha Erick Joel
 |
| 1. Parra Parra Alisson Melina
 | 1. Zambrano Cáceres Laura Estefanía
 |
| 1. Pinduisaca Pinta Sandra Verónica
 |  |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Lab E301 Por aula Virtual |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA VIRUS |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | Cultivo de células de fibroblastos |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.** |
| Aplica los protocolos de diagnóstico molecular mediante el uso de técnicas probadas para el diagnóstico de enfermedades virales |
| **OBJETIVO GENERAL** | Comprender las bases del diagnóstico de virus a través del cultivo de células |
| OBJETIVOS ESPECÌFICOS: |
| Comprender el cultivo de células de fibroblastos |
| **MARCO TEÓRICO** |
| El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Inicialmente fue considerada como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, hoy en día estas dificultades están superadas gracias a factores como los medios de composición definida, la disponibilidad de antibióticos, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, etc), dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, etc).Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen cuatro tipos de cultivo celular.Al establecer un cultivo celular se seleccionan las células que van a crecer en función de numerosos criterios: sólo formarán parte del cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar (bien en forma de monocapa, bien en suspensión).El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras.El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato porque son independientes del anclaje. Es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células madre ("stem cells") indiferenciadas.Al alcanzar la confluencia es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son más parecidas a su estado original. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células.Las líneas celulares que nunca se establecen como estables se mantienen euploides, como es el caso de fibroblastos humanos, fibroblastos de pollo y la glia humana. |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
|  |  |  |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| **Cultivo primario de fibroblastos**. Este protocolo describe los diferentes pasos para obtener un cultivo primario de fibroblastos a partir de la biopsia de piel de hámster. Los fibroblastos se derivan directamente de piel extraída. a. Se coloca 10 ml de suero fisiológico en una placa de Petri, empleando una jeringa estéril. b. Se introduce la biopsia de piel extraída en la placa para lavarla. c. Se pasa la biopsia a otra placa que contenía también 10ml de suero fisiológico para realizar un doble lavado. d. Utilizando el bisturí y la pinza se dividió la biopsia de piel en pequeños fragmentos de aproximadamente 0,3 x 0,3 cm. e. Se colocan tres fragmentos de piel, cada uno en una placa distinta. f. Utilizando una pipeta de vidrio estéril se agregaron 6ml de RPMI 1640 a cada placa. g. Se tapa las placas de Petri y se marcaron con lápiz de cera con la letra C y los números 1, 2, y 3 respectivamente, para facilitar su identificación. h. Se colocan las tres placas dentro de un beaker de 2000ml. i. Se sella bien el beaker con parafilm para permitir que las células mismas con su metabolismo crearan un ambiente enriquecido con CO2. j. Se coloca el beaker dentro de la incubadora a 37°C. k. Los fragmentos restantes se coloca en una placa de Petri con 15ml de suero fisiológico y se colocaron en la nevera para criopreservarlos6.3.4. **Mantenimiento del cultivo celular en placas de Petri**. La morfología y el crecimiento general de una población de células, y la presencia de cualquier contaminante microbiano, se deben comprobar regularmente con el microscopio.a. El segundo día, se saca de la incubadora el beaker con las placas, se extre la placa marcada con C1 y se vuelve a colocar el beaker debidamente sellado dentro de la incubadora con las otras dos placas.b. Se destapa la placa C1 y con una pipeta Pasteur se extrae el medio de cultivo y se desecha.c. Con un aplicador aséptico se frota el fondo de la placa para obtener células que pudieran estar adheridas a la placa.d. Se frota el aplicador sobre el portaobjetos para esparcir sobre este las células que pudieran estar adheridas al aplicador.e. Se aplica colorante Wright al portaobjetos y se colocó el cubreobjetos.f. Se observa al microscopio.g. El tercer día se saca de la incubadora el beaker con las placas, se extrajeron las placas restantes marcadas con C2 y C3.h. Usando una pipeta Pasteur se extrae el medio de las dos placas y se coloca en tubos de ensayo.i. Con un aplicador se frota el fondo de la placa para obtener células que pudieran estar adheridas a la placa.j. Se frota el aplicador sobre el portaobjetos para esparcir sobre este las células que pudieran estar adheridas al aplicador.k. Los tubos de ensayo que contiene el medio viejo se centrifuga por 10 minutos a 5000 rpm.l. El sobrenadante se desecha y el sedimento se esparce con un aplicador sobre un portaobjetos y se observa al microscopio, luego de colorearlo con Wright.m. Con una pipeta de vidrio estéril se agrega 6ml de medio fresco a cada placa.n. Se coloca las placas dentro del beaker debidamente sellado y se guara en la incubadora.o. Se observa al microscopio la muestra obtenida.p. Después del tercer día, se prosigue revisando cada 24 horas muestras del cultivo, obtenidas de la forma indicada, y cambiando el medio de cultivo de todas las placas, cada 48 horas, de igual forma que se hace en el tercer día. |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
| Fibroblastos |
| **OBSERVACIONES** |
| Las células fibroblatos pueden incorporar fácilmente a los virus del HPV |
| **CONCLUSIONES** |
| Después de reproducir el método cuatro veces, se obtiene un estándar de cultivo de fibroblastos in vitro la metodología aplicada funciona, es válida, y fácilmente reproducible. De acuerdo con los resultados encontrados, se puede decir que la estandarización de un cultivo celular es un proceso corto pero que requiere de mucha dedicación, esfuerzo y cuidados especiales, pues de no tener esto en cuenta al realizar un cultivo se puede incurrir en una pérdida de tiempo y dinero |
| **RECOMENDACIONES** |
| Realizar limpieza del cuarto de cultivo rutinariamente según lo descrito en los protocolos establecidos y trabajar en condiciones de asepsia, con el fin de evitar la contaminación de los cultivos o del material y reactivos del laboratorio.Mantener en adecuadas condiciones de almacenamiento los reactivos según la especificación de los proveedores, especialmente las soluciones de enzimas, ya que estas son susceptibles a degradarse si no se encuentran en la temperatura adecuada. Para esto se pueden realizar alícuotas del volumen suficiente para cada ensayo con el fin de que solo se descongele la proporción que se va a utilizar |
| **BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA** |
| Biología molecular Salazar Montes Adriana Mc Graw Hill Interamericana EditoresBiología molecular Gómez Marín Jorge Enrique Corporación para Investigaciones BiológicasBiología molecular y celular Chandart Nalini Wolters Kluwer Health Biología Molecular y Herencia. Wallace Robert A. Editorial Trillas |
| **Mgs. Ximena Robalino F.****DIRECTORA DE CARRERA** | **DOCENTE** |