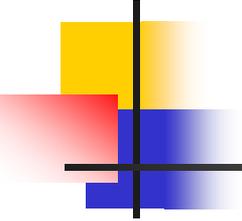


PRODUCCIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Lic. Zulay Arvelo

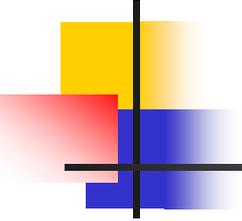
Dpto. Cultivo Celular



CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR Ma104



- * Población clonal proveniente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*)
- * Morfología: parecida a epitelial
- * Condiciones de crecimiento:
 - son adherentes y crecen a 37°C
 - tienen un límite de 24 pasajes



CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR Ma104



- * Condiciones de crecimiento:
 - Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM),
L-glutamina 2 mM,
aminoácidos no esenciales 0,1 mM,
suero fetal bovino 10%
- * Susceptibles al rotavirus de los simios
- * Se manipulan con nivel de bioseguridad 1

REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



- * Disponer de áreas adecuadas
- * Utilizar insumos de calidad
- * Disponer de equipos adecuados
- * Contar con personal adecuado
- * Aplicar procedimientos adecuados

REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



DISPONER DE AREAS ADECUADAS

* Deben existir áreas separadas de acuerdo a la actividad: oficinas, lavado, embalaje, preparación de medios, control de calidad, almacenamiento de insumos y productos, limpia

* En el área limpia se deben controlar partículas que ingresen y se generen:

- filtros HEPA en entradas de aire
- barreras de contención
- presión positiva
- uso de materiales, equipos e indumentaria que liberen pocas partículas
- comportamiento adecuado del operario
- limpieza y desinfección con regularidad



REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



UTILIZAR INSUMOS DE CALIDAD



- * Material acondicionado para cultivo celular (lavado y esterilizado)
- * Agua pretratada (destilada, desionizada, ultrafiltrada)
- * Medios y suplementos estériles, de composición adecuada
- * Suero fetal bovino certificado (microorganismos y pirógenos)
- * Células certificadas (especie de origen, condición microbiológica)

REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



DISPONER DE EQUIPOS ADECUADOS



Estufa



Microscopio invertido



Filtro



Equipo de
ultrafiltración de
agua



Termo N₂ líquido



Campana de flujo
unidireccional

REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



CONTAR CON PERSONAL ADECUADO



- * El personal debe estar calificado para su cargo tomando en cuenta su formación, experiencia y habilidades
- * El personal que labora en áreas limpias debe poseer destrezas, hábitos de trabajo y actitudes especiales
- * El personal debe recibir entrenamiento al ingresar y luego en forma continua según se requiera, para reforzar y corregir.

REQUERIMIENTOS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



APLICAR PROCEDIMIENTOS ADECUADOS

- * Acondicionamiento del material (lavado, embalaje, esterilización)
- * Preparación de medios y suplementos (elaboración, esterilización)
- * Mantenimiento y preservación de líneas celulares (Bancos Maestro y de Trabajo ,subcultivos)
- * Controles de calidad (insumos, equipos, ambiente, personal, procedimientos y documentación)

PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Pautas iniciales

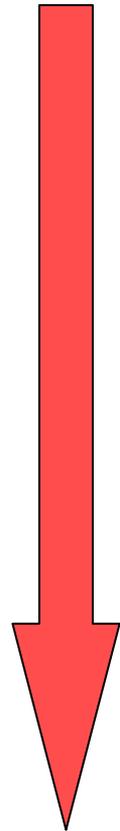
* Verifique que el cultivo no este contaminado

* Verifique al microscopio las buenas condiciones de crecimiento del cultivo celular

* Registre la actividad a realizar

* Precaliente la sol. tripsina-verseno y el medio de crecimiento a 37°C

* Vístase con la indumentaria apropiada e ingrese al área limpia



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104



Como vestirse ?

1. Dejar objetos personales en el lugar destinado a ello

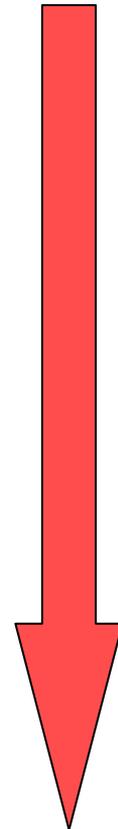
2. Lavarse las manos

3. Colocarse cubrezapatos antes de ingresar al área limpia

4. Ingresar al vestuario y colocarse otros cubrezapatos

5. Colocarse el gorro que cubra las orejas.
Damas recoger el cabello

6. Escoger el uniforme de talla adecuada y revisar integridad del empaque



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Como vestirse ?



7. Abrir empaque y colocarse prenda que cubra parte inferior del cuerpo

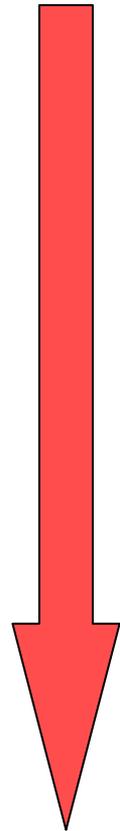
8. Colocarse prenda que cubra parte superior del cuerpo

9. Verificar ante el espejo que el uniforme esta bien colocado

10. Caminar por alfombra adhesiva mientras se ingresa a precabina

11. Desinfectarse las manos con alcohol 70%

12. Colocarse los guantes estériles y el tapaboca



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104



Disgregación de la monocapa celular
(1)

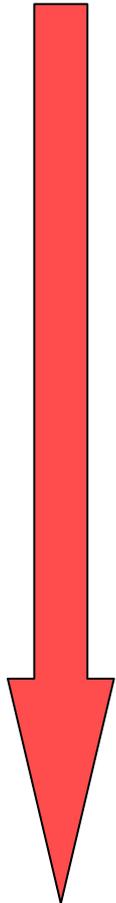
* Desinfecte la campana de flujo laminar y todo lo que ingrese a esta con alcohol 70%

* Descarte el medio de crecimiento

* Enjuague la monocapa con sol. tripsina-verseno hasta observar opacidad

* Agregue sol. tripsina-verseno (3ml/75cm² de área)

* Incube hasta observar al microscopio las células redondeadas y desprendidas del envase



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104



Disgregación de la monocapa celular
(2)

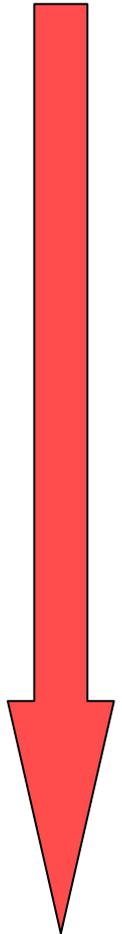
* Agregue 7ml medio de crecimiento + suero fetal bovino

* Pipetee suave para separar las células

* Transfiera la suspensión a un envase adecuado

* Complete a un volumen para contar con medio de crecimiento + 2% suero fetal bovino

* Introduzca un magneto y agite suavemente



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Contaje de células viables

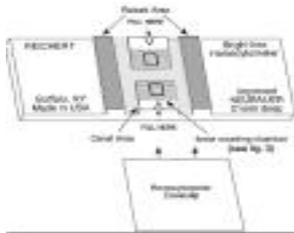


Fig. 2. Preparation of counting chamber and 10 points.

* Limpie y ensamble el hemocitómetro adecuadamente

* Mezcle en tubos por duplicado 0.2ml de suspensión original + 1.8ml de colorante vital

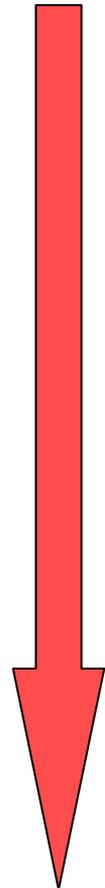
* Llene con cuidado la cámara, un tubo a cada retículo

* Examine los retículos al microscopio con objetivo 10X

* Cuente las células viables en los cuadrados grandes de cada esquina y el cuadrado central de ambos retículos

* Calcule el número de células viables/ml con la formula

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{total células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{cuadrados contados}} \times \text{factor dil. cámara} \times \text{factor dil. colorante}$$



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Obtención de suspensión final

* Determine el volumen de suspensión original necesario para preparar la suspensión final con la formula

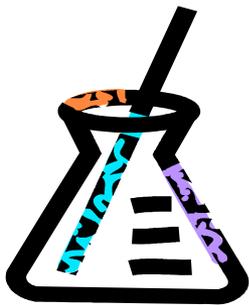
$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

V1= volumen (ml) de suspensión original

V2= volumen (ml) de suspensión final deseada

C1= n° de células viables/ml en suspensión original

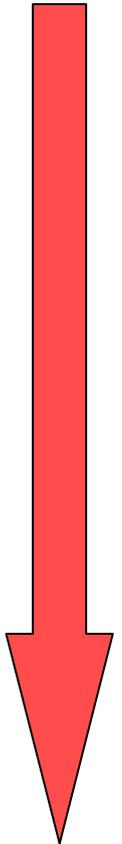
C2= n° de células viables/ml en suspensión final deseada



* Transfiera el volumen de suspensión original calculado al envase receptor

* Complete al volumen final con medio de crecimiento + 2% suero fetal bovino

* Introduzca un magneto y agite suavemente



PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS Ma104

Control de calidad microbiológico

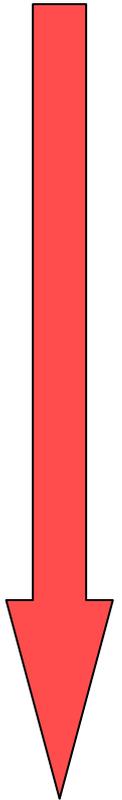


* Realice controles de esterilidad de la suspensión original transfiriendo ,por duplicado, 1 ml de suspensión de contaje a cada uno de los caldos nutritivos: tioglicolato, tripticasa de soya y maltosado de Sabouraud

* Incube, de cada caldo, un tubo a 37°C y un tubo a 25°C

* Observe regularmente durante 14 días los caldos tioglicolato y tripticase de soya, y durante 21 días los caldos maltosados

* Reporte los resultados



BIBLIOGRAFÍA



- = ATCC. Cell Biology Catalog. Rockville, Maryland; 2003/2004
- = Clavell L y Rossi L. Áreas limpias. Facultad de Farmacia. U.C.V. Caracas; 2000
- = Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. New York; 1994
- = Normas de Buenas Prácticas de Fabricación para la Industria Farmacéutica. División de Drogas y Cosméticos. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas; 1990
- = Bird BR and Forrester FT. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. C.D.C. Atlanta; 1981
- = ATCC. Quality Control Methods for Cell Lines. 2nd ed. Rockville. Maryland; 1992

GRACIAS

