

Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

Práctica 3.3. Protocolo de aislamiento celular para el seguimiento metabólico de ácidos grasos

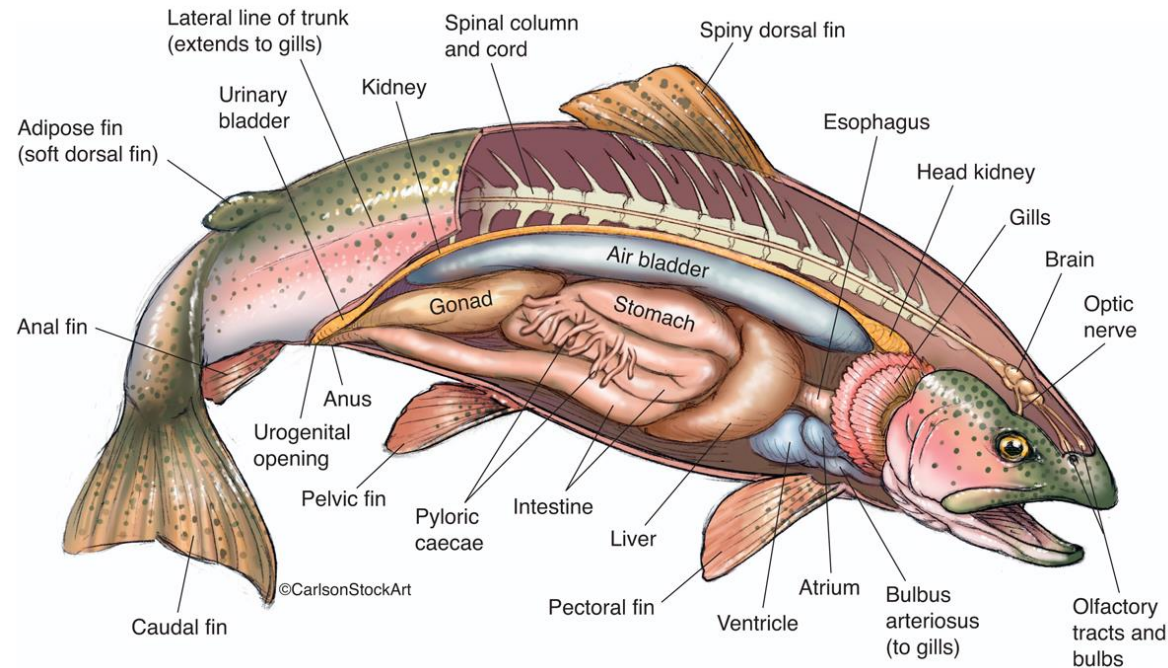
EL PRINCIPIO DE LAS 3 ERRES

Reemplazo - Métodos que eviten o ayuden a reemplazar el uso de animales

Reducción - Métodos que ayuden a reducir el número de animales que se usan en experimentos

Refinamiento - Métodos que ayuden a minimizar cualquier dolor o angustia y mejoren el bienestar animal

1. Antes de empezar con la obtención de las células encender el baño, el cooling de la centrifuga, pesar la colagenasa* y descongelar los medios de cultivo. Todas las soluciones y los tubos que contienen células se mantienen en hielo picado durante todo el proceso.



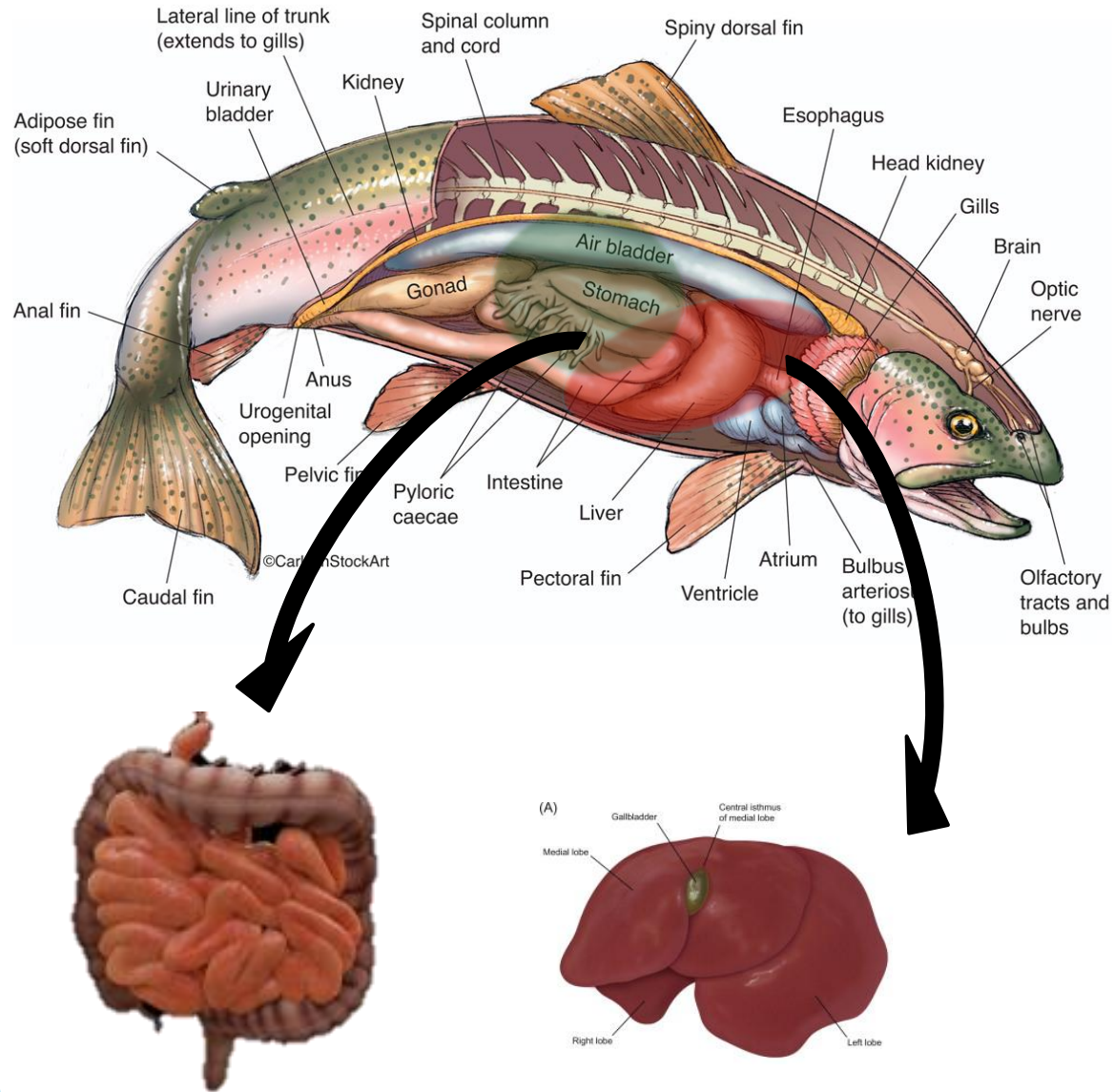
*Por cada órgano se utilizará una solución de **10 mg de colagenasa / 10 ml de HBSS** (*Hanks Balanced Salt Solution*)

2. Pesar el pez

3. Sacrificar el animal por métodos éticos (según comités y normativas correspondientes)

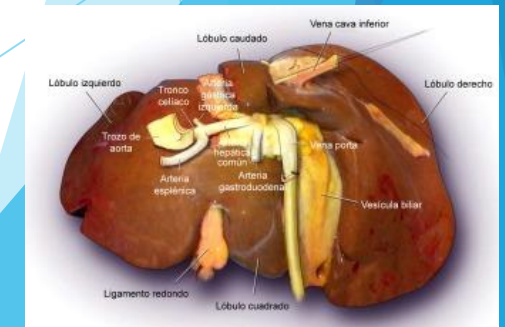
4. Extraer sangre de la vena cava abdominal con agujas heparinizadas y trasvasar a un Eppendorf. Se centrifuga a temperatura ambiente, 3000 rpm, 20 minutos

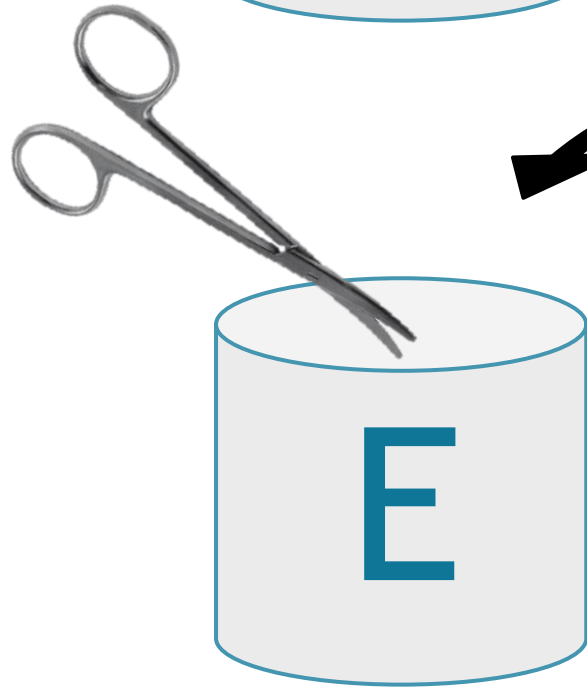
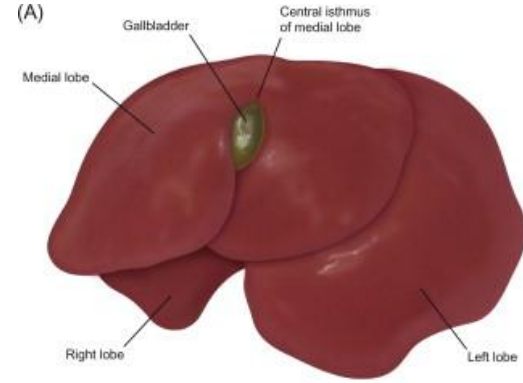
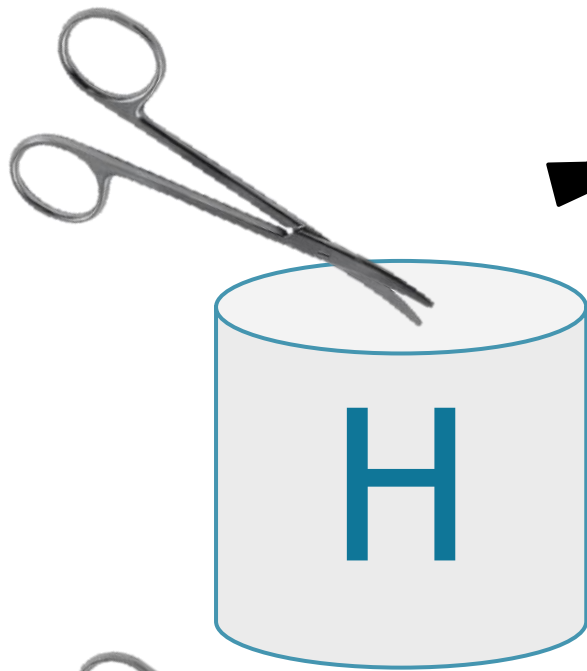
5. Extraer el hígado del animal, retirando la vesícula biliar y los vasos asociados y pesarlo.



6. Se perfunde el hígado con solución fisiológica por medio de aguja introducida en las venas mayores (porta y cava inferior). Con ello se elimina una buena parte de las células sanguíneas.

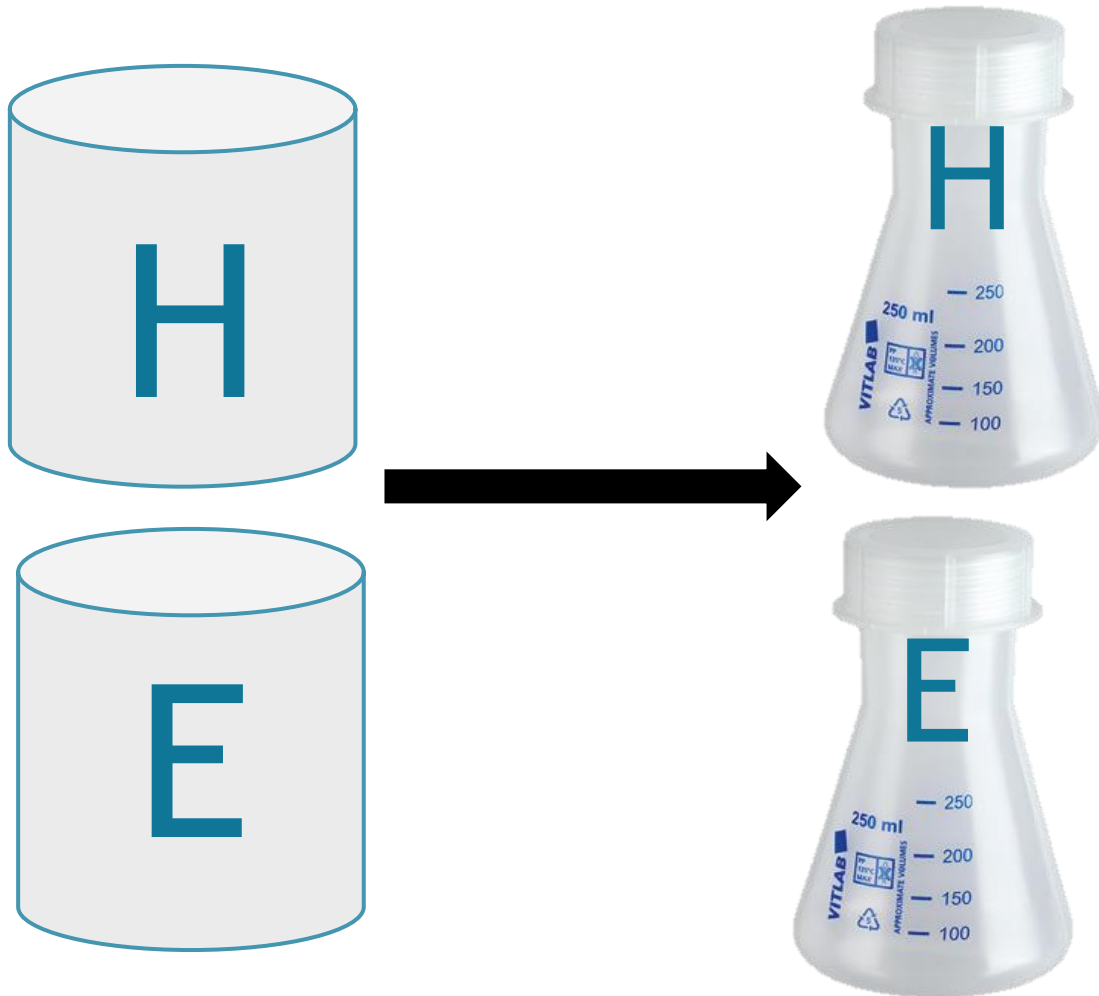
7. Extraer el intestino, lavando y vaciando su interior con solución fisiológica.





8. Se transfiere el hígado y el intestino a un vaso de plástico rotulado (H y E, respectivamente), con un poco de solución HBSS/colagenasa y se va cortando el tejido en trozos muy pequeños con tijeras de disección.

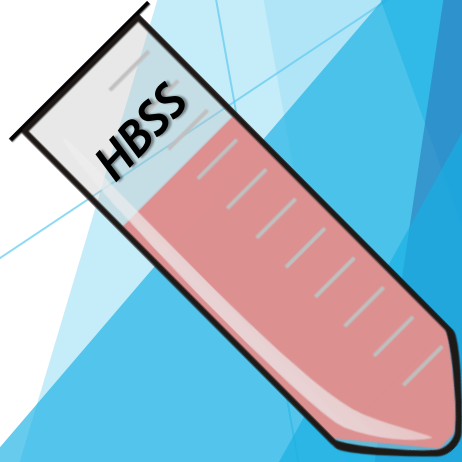
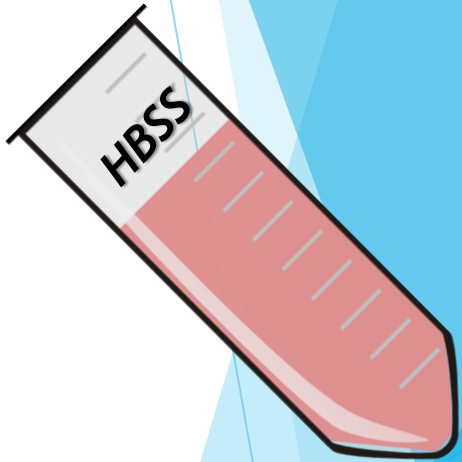
9. Se pasa todo a un Erlenmeyer de plástico y con tapa, añadiendo el resto de HBSS/colagenasa.



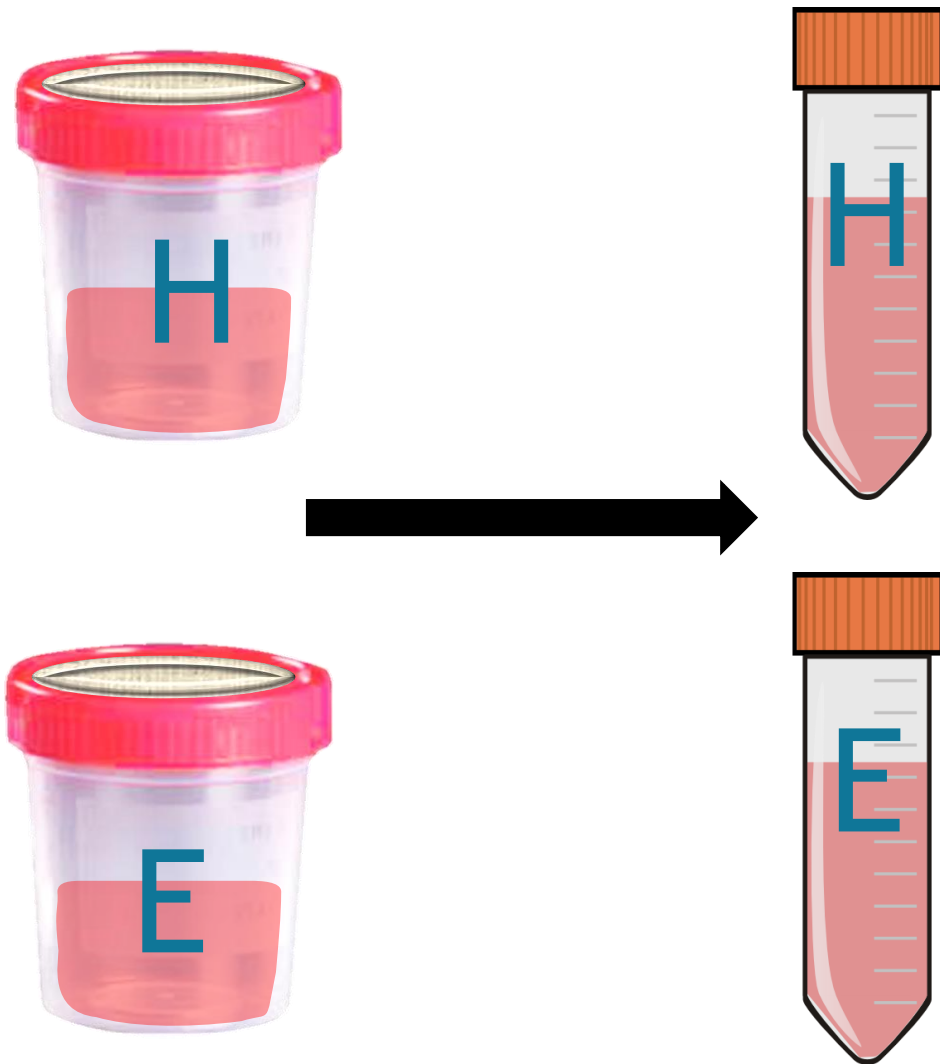
10. Se deja incubando en agitación durante 20 minutos a 35°C



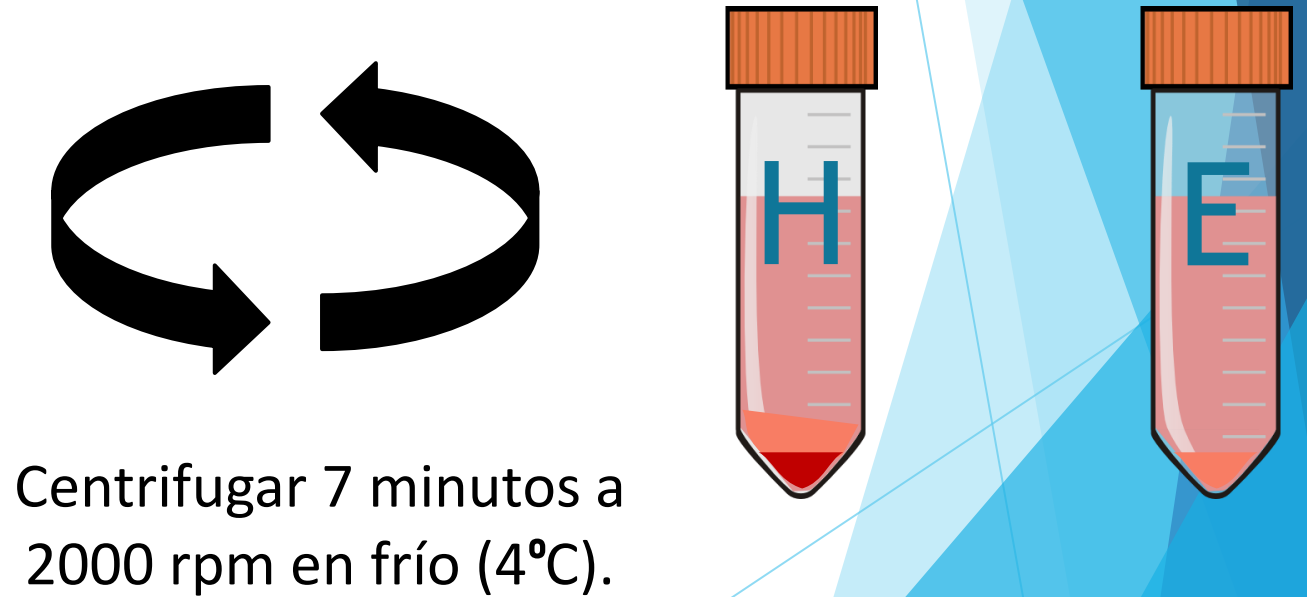
11. Se hace un filtrado (ayudándose con un émbolo de goma de una jeringuilla, sin machacar en exceso), a través de una malla de 60-100 μm usando 15 ml de HBSS frío. Se va lavando la malla con 10 ml primero, dejando 5 ml para aprovechar todo bien en el lavado y escurrido final.



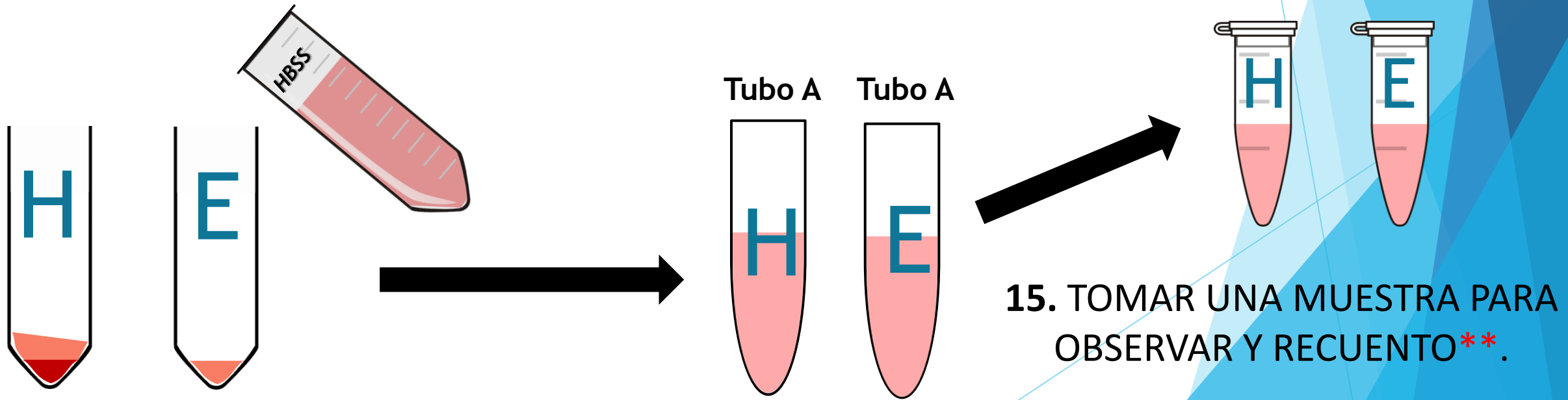
12. Se transfiere el filtrado de cada tejido a Falcons de 50 ml. Enrasar a 30 ml con HBSS.



13. En el caso del hígado obtengo 3 fases: un sobrenadante, un pellet rosado y un pellet en la punta del tubo que contiene el grueso de las células sanguíneas. En el intestino no suele darse el pellet de sangre



14. Tirar el sobrenadante y resuspender la fase de pellet rosado que contiene el grueso de los hepatocitos o enterocitos, suavemente con 5 ml de HBSS que se dejan deslizar por la pared, para no remover la sangre demasiado (golpear suavemente el tubo sobre una bola de papel para ir moviendo el pellet de hepatocitos)*. Con mucho cuidado y sin apurar demasiado transferimos estas células a un tubo de ensayo de cristal de 12 ml (TUBO A). Repetimos el proceso con otros 5 ml de HBSS.

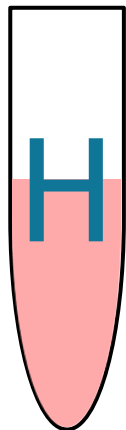


Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

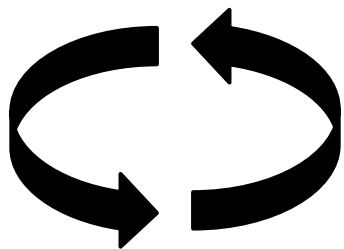
* Si se desea incubar parte de las células para diversos estudios, deben disolverse en un medio nutritivo tipo *M199*, *Leibovitz*...etc. Los hepatocitos flotan mucho y siempre quedan células en los sobrenadantes y el intestino tiende a segregar moco que dificulta la adhesión del pellet. En ambos casos, para aprovechar bien las células, conviene subir el volumen de solución limpia y fría (HBSS o medio de cultivo) y volver a centrifugar SI ES NECESARIO para recoger un buen pellet).

Resuspender el pellet en M199 de acuerdo a su cantidad e incubaciones que vayamos a necesitar. Si el pellet es grande resuspender en 25-30 ml (6 ml por incubación, en nuestro caso, unos $5-10 \times 10^6$ cels/ml, normalmente es suficiente para 4 incubaciones: control, 18:2n-6, 18:3n-3 y EPA), dejando 1 ml de células para recuento y viabilidad celular y proteína a tiempo cero (0h).

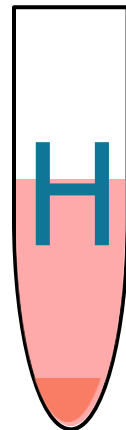
Tubo A



16. Centrifugar
5min a 2000rpm



Tubo A



Tubo A



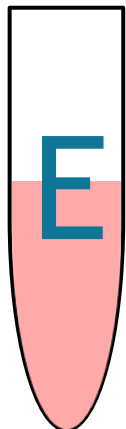
17. Retirar el
sobrenadante

18. Añadir
2 ml de KCL

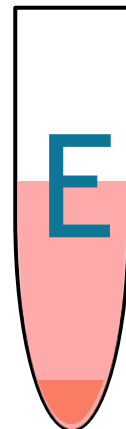
Tubo A



Tubo A



Tubo A



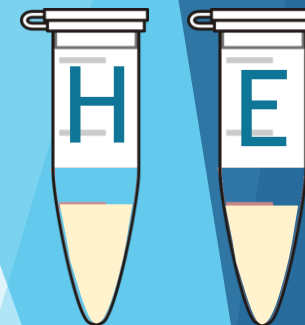
Tubo A



Tubo A



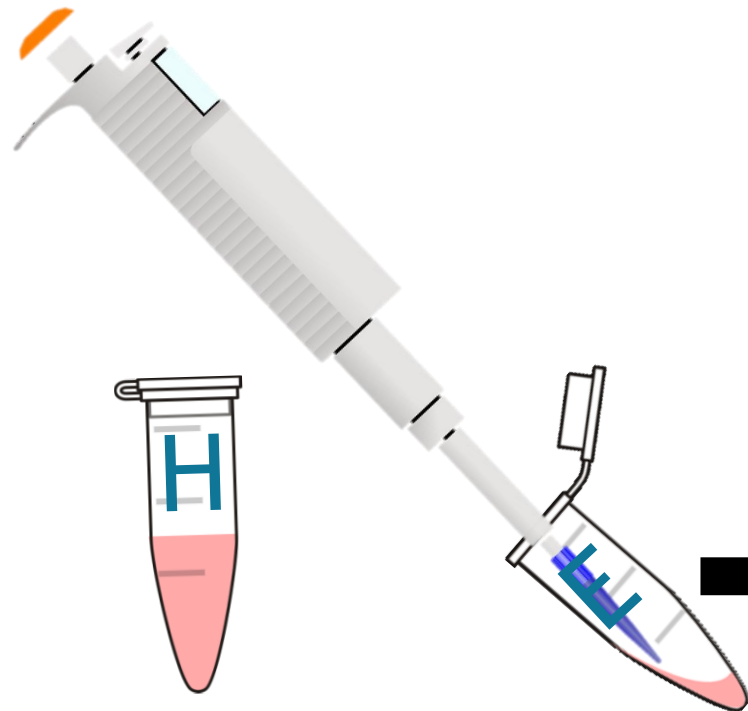
19. Agitar y coger 100µl
para determinación de
proteína.



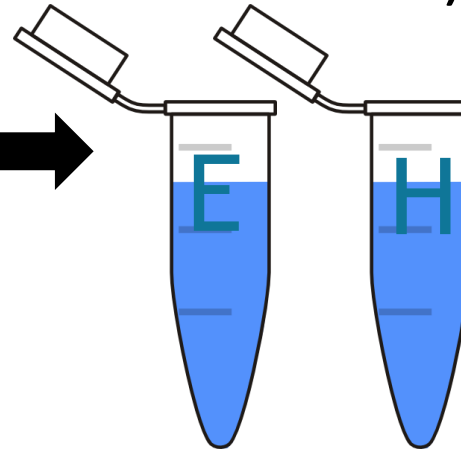
20. Continuar con
el protocolo de la
extracción de
lípidos

**OBSERVACIÓN Y RECuento CELULAR

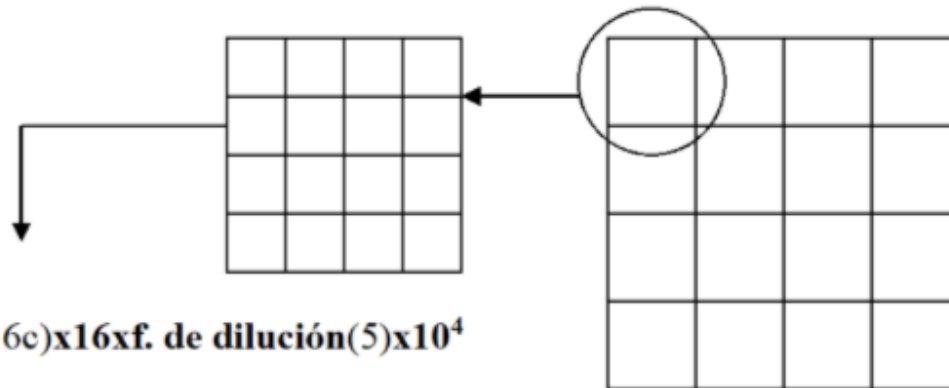
Diluir los 100µl de recuento con
400µl de Trypan Blue (previamente
disuelto 1:4 con HBSS)



Tomar 100 µl de la
suspensión de células
para recuento celular.



Cargar la cámara de
NEUBAUER y dejar
reposar las células
durante 5-10
minutos.



$$n^{\circ} \text{ cél./ml} = \Sigma \text{ células}(16c) \times 16 \times \text{f. de dilución}(5) \times 10^4$$



Universidad
de La Laguna



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



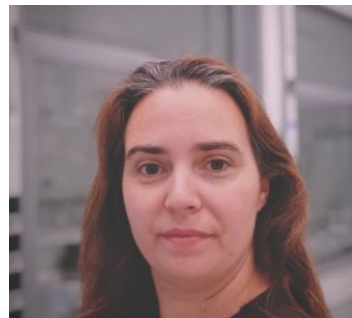
Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta

