



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Proyecto de Innovación y Mejora de la Calidad Docente**

**Convocatoria 2014**

**Nº de proyecto: 191**

**Título del proyecto:**

**La enseñanza de ciencias básicas biomédicas en el Grado de Logopedia.**

**Utilización de técnicas histológicas y de cultivos celulares para confeccionar material demostrativo de la anatomía y la fisiología de los órganos de la audición y el lenguaje**

**Nombre del responsable del proyecto:**

**Francisco Javier Carricondo Orejana**

**Centro: Facultad de Medicina**

**Departamento: Oftalmología y Otorrinolaringología**

## **1. Objetivos propuestos en la presentación del proyecto (Máximo 2 folios)**

### ***Objetivos generales:***

- Mejorar la comprensión de los contenidos relacionados con los campos más básicos de áreas biomédicas, como la histología, citología o la fisiología.
- Relacionar el conocimiento de estos contenidos con otras áreas para ahondar en el intercambio de conocimiento entre diferentes áreas, pero también para que los graduados en logopedia puedan comprender perfectamente conceptos y contenidos importantes para el tratamiento de sus pacientes pero de la naturaleza biomédica más básica.

### ***Objetivos específicos:***

- Utilizar las técnicas de cultivos celulares para la obtención de preparaciones de células aisladas de diferentes tejidos para poder completar el estudio básico de la célula.
- Realizar colecciones de preparaciones histológicas de aquellos tejidos más relevantes para la comprensión de la asignatura "Anatomía y Fisiología de los Órganos del Lenguaje".
- Realizar preparaciones histológicas de la cóclea, del receptor auditivo y de la vía auditiva para la asignatura "Fisiología de los Órganos de la Audición. Bases de Audiología".
- Preparar un "cuaderno de prácticas" que sirva de guía a los alumnos para la observación y el aprendizaje de las preparaciones. Además servirá para que los alumnos puedan responder algunas cuestiones de la parte práctica de la asignatura.
- Crear un banco de imágenes y vídeos digitales para su posterior edición, montaje y presentación en la plataforma del campus virtual, moodle, para que los alumnos siempre puedan disponer de esta guía para su estudio.

## **2. Objetivos alcanzados (Máximo 2 folios)**

### ***Objetivos generales:***

- Se ha mejorado la comprensión de los contenidos relacionados con los campos más básicos de áreas biomédicas, como la histología, citología o la fisiología, dado el acceso a material histológico de poco acceso para ellos.
- Se ha relacionado el conocimiento de estos contenidos con otras áreas para ahondar en el intercambio de conocimiento entre diferentes áreas, para que los graduados en logopedia puedan mejorar el tratamiento de sus pacientes.

### ***Objetivos específicos:***

- Se han empleado técnicas de cultivos celulares para la obtención de preparaciones de células aisladas de diferentes tejidos para poder completar el estudio básico de la célula.
- Se han realizado colecciones de preparaciones histológicas de aquellos tejidos más relevantes para la comprensión de la asignatura "Anatomía y Fisiología de los Órganos del Lenguaje".
- Se han realizado preparaciones histológicas de la cóclea, del receptor auditivo y de la vía auditiva para la asignatura "Fisiología de los Órganos de la Audición. Bases de Audiología".
- Se ha preparado un "cuaderno de prácticas" que sirve de guía a los alumnos para la observación y el aprendizaje y que contiene esquemas mudos de modelos anatómicos. Además servirá para que los alumnos puedan responder algunas cuestiones de la parte práctica de la asignatura.
- Se está realizando un banco de imágenes junto con esquemas, dibujos y vídeos digitales para su posterior edición, montaje y presentación en la plataforma del campus virtual, moodle, para que los alumnos siempre puedan disponer de esta guía para su estudio.

### **3. Metodología empleada en el proyecto (Máximo 1 folio)**

#### ***Metodología***

Toda la metodología del presente Proyecto de Investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología de la Audición del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

#### a) Animales:

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar para el presente Proyecto de Investigación. Todos los animales han sido estabulados en el Animalario Central de la Facultad de Medicina de la UCM.

Para las muestras histológicas se utilizaron animales adultos mientras que para los cultivos se usaron ratas recién nacidas.

#### b) Procesado de tejidos:

Las muestras objeto de estudio procedieron de diferentes tejidos como el sistema nervioso central, músculo, hígado, hueso, cartílago, etc. Para ello, los animales han sido perfundidos intracardiamente, bajo anestesia profunda, con fijadores histológicos (paraformaldehído al 4% o alcohol acético al 2%). Tras la perfusión, se extrajeron las muestras de tejido que pasaron un tiempo variable de postfijación en el mismo fijador, hasta que comenzó la fase de inclusión en parafina. Para ello, el tejido debe ser deshidratado mediante el paso por alcoholes de gradación creciente hasta su inclusión en parafina.

#### c) Procesado del receptor auditivo (cócleas) y la vía auditiva:

La obtención y procesado de la cóclea para el estudio del receptor auditivo requiere una metodología específica ya que está rodeada por tejido óseo. Así, tras la perfusión intracardiaca con el fijador histológico de elección, se debe realizar una perfusión específica de fijador en el interior de la espiral coclear, una perfusión perilinfática, para sustituir las linfas cocleares por fijador histológico. Tras esto, se realiza la postfijación y posterior inclusión en parafina. El sistema nervioso central seguirá el mismo procesado de inclusión en parafina previamente expuesto, pero las cócleas antes de eso tienen que ser decalcificadas para eliminar el calcio del tejido óseo y que posteriormente pueda ser cortado en secciones por el microtomo. Además, los cortes histológicos de la cóclea son midmodiolares, es decir, al ser una espiral, solo los cortes que estén en el centro de la espiral coclear serán representativos de la estructura morfológica del receptor auditivo.

#### d) Seccionado histológico:

Tras la inclusión en parafina de la muestra histológica, se pasa al seccionado y obtención de los cortes histológicos mediante la utilización de microtomos de parafina. El seccionado se realizará a un grosor de 10 micrómetros.

e) Tinciones histológicas:

Una vez en los portas, la parafina de los cortes debe ser eliminada antes de realizar la tinción de las secciones. El desparafinado se realiza mediante la inclusión de los portaobjetos con los cortes histológicos en alcoholes de gradación decreciente hasta el agua. A partir de aquí se realizan las tinciones histológicas, cada una con su protocolo específico. Estas tinciones incluyeron hematoxilina-eosina, violeta de cresilo, van gilson, etc. y una vez terminada la tinción, los cortes se cubrieron con cubreobjetos de vidrio para su posterior conservación y almacenamiento.

f) Procesado de los cultivos celulares:

Los cultivos celulares se realizaron en placa multipocillo de 12 pocillos. Incluyen el procesado de diferentes tejidos para la obtención de células aisladas en el cultivo. Para ello, y en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas, se realiza la extracción del tejido objeto de estudio. Mediante las técnicas de cultivos clásicas, se realizó la disección mecánica y enzimática del tejido para obtener una suspensión de células disociadas que, posteriormente se cultivaron y mantuvieron durante un tiempo específico para que las células pudieran proliferar. El procesado posterior sigue la misma metodología de fijación y tinción sin la inclusión en parafina y seccionado posterior ya que el cultivo se realiza en dos dimensiones y no se hace necesaria el seccionamiento del mismo.

#### **4. Recursos humanos (Máximo 1 folio)**

##### ***Justificación de la composición del Grupo***

El grupo incluye tanto médicos especialistas de otorrinolaringología como biólogos, una farmacéutica y una logopeda. Esta composición pluridisciplinar permitió un acercamiento mucho más eficaz a las características de las asignaturas propuestas para el desarrollo del presente Proyecto. Así:

- Francisco Javier Carricondo Orejana: Dr. en Ciencias Biológicas. Prof. Ayudante Doctor del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología.
- Joaquín Poch Broto: Dr. en Medicina y Cirugía. Catedrático de Otorrinolaringología. Director del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología.
- Bárbara Romero Gómez: Licenciada en Ciencias Biológicas, Máster en Ciencias Biomédicas, Doctoranda y Prof. Asociado del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología
- Cristina Francés Ferriz: Licenciada en Farmacia, Máster en Neurociencias y Doctoranda y Colaboradora Honorífica del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología
- Carmen Pose Utrilla: Graduada en Logopedia. Matriculada en el Master de Ciencias Biomédicas UCM (2014-15)

- Fernando Rodríguez Gómez: Dr. en Medicina y Cirugía. Especialista ORL. Prof. Titular del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología.

- M<sup>a</sup> Cruz Iglesias Moreno: Dr. en Medicina y Cirugía. Especialista ORL. Prof. Asociado del Dpto. de Oftalmología y Otorrinolaringología.

Las asignaturas propuestas para el desarrollo del presente Proyecto, "Anatomía y Fisiología de los Órganos del Lenguaje" y "Fisiología de los Órganos de la Audición. Bases de Audiología", tal y como se ha dicho anteriormente, poseen claramente contenidos de naturaleza multidisciplinar, por lo que un equipo de estas características puede ser el adecuado para llevarlo a cabo.

De esta manera, mientras que los componentes de formación más básica, biólogos y una Máster en Neurociencias, podrán desarrollar los contenidos más básicos de este proyecto que tengan que ver con la biología misma de las células y tejidos. El resto de componentes de equipo, de formación más clínica, basculan entre la experiencia otorrinolaringológica, que aportarán su experiencia en la verificación de la calidad de las preparaciones resultantes y su adecuación a los objetivos de las asignaturas, y la logopeda que será de una inestimable ayuda para comprender las necesidades específicas de los graduados en logopedia en su campo clínico y como se pueden mejorar con la ayuda de el presente Proyecto.

### ***Asignación de tareas de los miembros del Grupo***

La mayor parte de las tareas se han asumido por varios miembros del equipo. Así:

- Francisco Javier Carricondo Orejana: Coordinación del proyecto, cultivos celulares, obtención de las muestras histológicas y cócleas, fotografía y edición de video digital, confección de la memoria del proyecto.

- Joaquín Poch Broto: Coordinación del proyecto, evaluación de las preparaciones de oído interno obtenidas, confección de la memoria del proyecto.

- Bárbara Romero Gómez: Cultivos celulares, obtención de las muestras histológicas y cócleas, procesado histológico de las muestras y tinciones, fotografía y edición de video digital.

- Cristina Francés Ferriz: Cultivos celulares, obtención de las muestras histológicas y cócleas, procesado histológico de las muestras y tinciones, fotografía y edición de video digital.

- Carmen Pose Utrilla: Cultivos celulares, obtención de las muestras histológicas y cócleas, procesado histológico de las muestras y tinciones, fotografía y edición de video digital.

- Fernando Rodríguez Gómez: Evaluación de las preparaciones de oído interno obtenidas, adecuación de las imágenes y vídeos digitales a la docencia de las asignaturas.

- M<sup>a</sup> Cruz Iglesias Moreno: Evaluación de las preparaciones de oído interno obtenidas, adecuación de las imágenes y vídeos digitales a la docencia de las asignaturas.

## **5. Desarrollo de las actividades (Máximo 3 folios)**

### ***Cronograma del Proyecto actividades***

Teniendo en cuenta que el proyecto comenzó en abril, el plan de trabajo fue:

- a) Adquisición y estabulación de los animales de experimentación: Abril-Mayo 2014
- b) Trabajo de cultivos celulares: Mayo-Julio 2014
- c) Procesado histológico de tejidos: Mayo-Julio 2014
- d) Tinciones: Septiembre-Octubre 2014
- e) Fotografiado y edición de las imágenes y videos obtenidos: Septiembre-Noviembre 2014
- f) Realización de la memoria: Octubre-Noviembre 2014

### ***Plan de Trabajo***

El plan de trabajo se llevó a cabo de manera secuencial para poder conseguir los objetivos del trabajo de la manera más eficaz posible.

Los animales experimentales se fueron utilizando para la obtención de tejidos tanto para su procesado histológico como para la realización de los cultivos celulares.

Debido a la necesidad de utilizar neonatos de rata para los cultivos celulares, hay que esperar a que nazcan para poder utilizarlos, por lo que en primer término se utilizarán los individuos adultos para el trabajo histológico de los tejidos y la obtención de preparaciones microscópicas.

Las muestras obtenidas en esta primera fase, estarán destinadas a ser procesadas como material histológico para preparaciones. Como ya se ha indicado, las muestras objeto de estudio procederán de diferentes tejidos, para lo cual, el protocolo general expuesto anteriormente tendrá que ser adaptado. Así, encontraremos variaciones en el procesado de tejidos en general y la cóclea. De hecho, de cada animal se extraerán los diferentes tejidos de estudio y las cócleas, pero cada una de las muestras llevará un procesado diferente. En general, los tejidos fueron incluidos en parafina rápidamente tras un corto periodo de postfijación, mientras que las cócleas necesitarán, tras la postfijación, de un periodo variable, pero no menor de 15 días, de decalcificación para que la estructura ósea de la lámina de los contornos coclear no sea un impedimento para que el microtomo pueda cortar la muestra. Por ello, las

primeras muestras que se incluirán, serán las muestras de tejidos que posteriormente serán seccionadas secuencialmente en el microtomo y colocadas en portaobjetos para su posterior tinción. Las cócleas, una vez decalcificadas, siguieron el mismo camino de procesado hasta la obtención del bloque de parafina y posterior seccionado y almacenamiento.

Los cultivos celulares de los tejidos de estudio se realizaron a partir de neonatos de rata. Este hecho asegura la viabilidad y proliferación celular. Tras aplicar el protocolo general anteriormente comentado con las especificidades para cada tejido particular, el cultivo tiene que tener unos días o semanas de estancia en placa para que las células puedan proliferar y diferenciarse. Tras ello, el cultivo fue fijado y preparado para su tinción.

A medida que se vayan acumulando muestras en portaobjetos, se irán haciendo las técnicas de tinción que se proponen para este trabajo y que serán válidas tanto para las muestras de tejido generales como para las cócleas. Esto asegurará el hecho de presentar tanto las células aisladas como tejidos bajo el microscopio en diferentes condiciones que aportarán diferentes puntos de vista de la estructura histológica de las muestras.

Los alumnos podrán ver estas preparaciones utilizando los microscopios de prácticas del laboratorio, pero uno de los objetivos del trabajo es digitalizar este material para poder localizarlo en un futuro en el campus virtual para que pueda estar siempre a disposición de los alumnos.

Para ello, se realizarán fotos con cámara digital conectada a un microscopio y videos de todo el proceso.

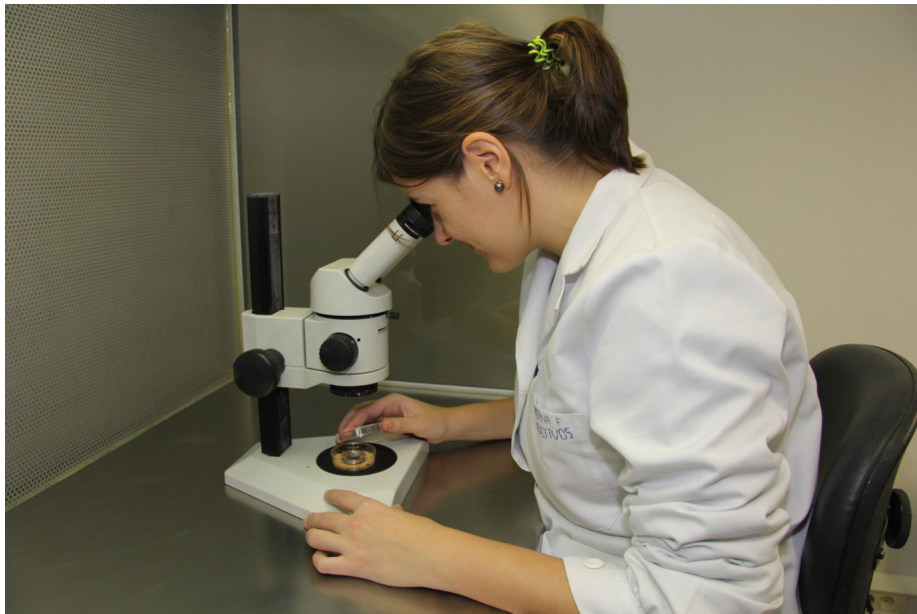
## 6. Anexos

### Material gráfico asociado al proyecto

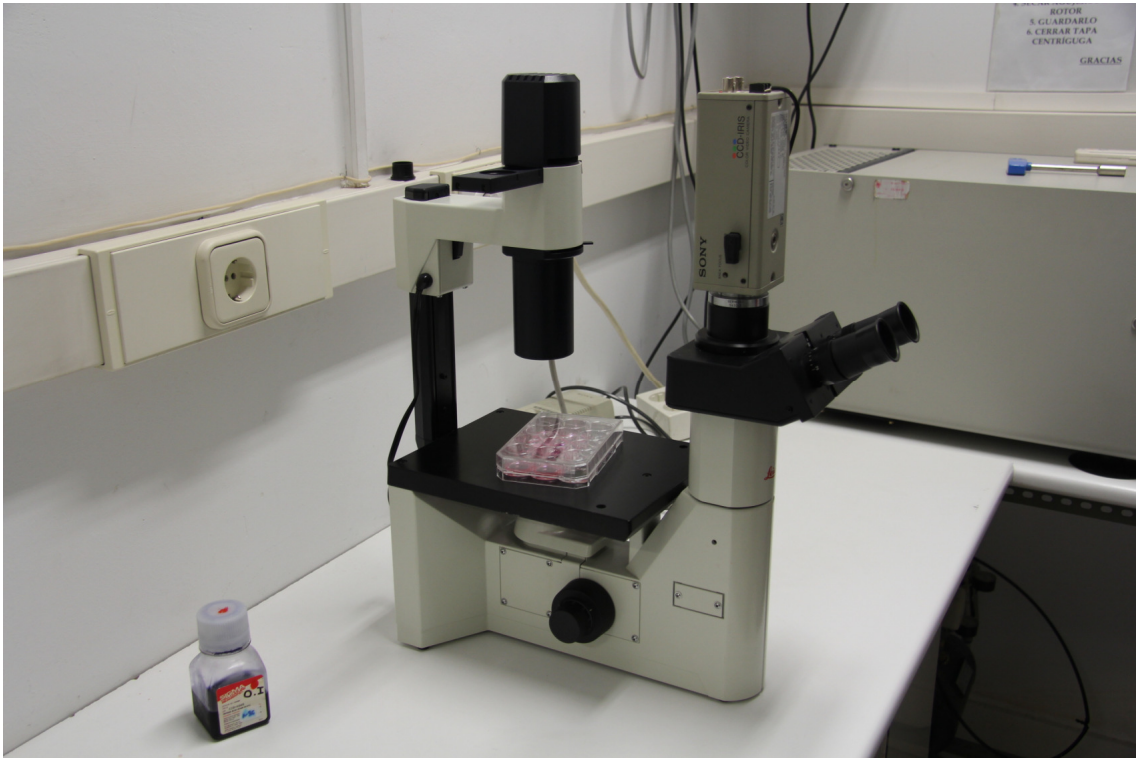
#### a) Técnica de cultivos celulares y muestras obtenidas



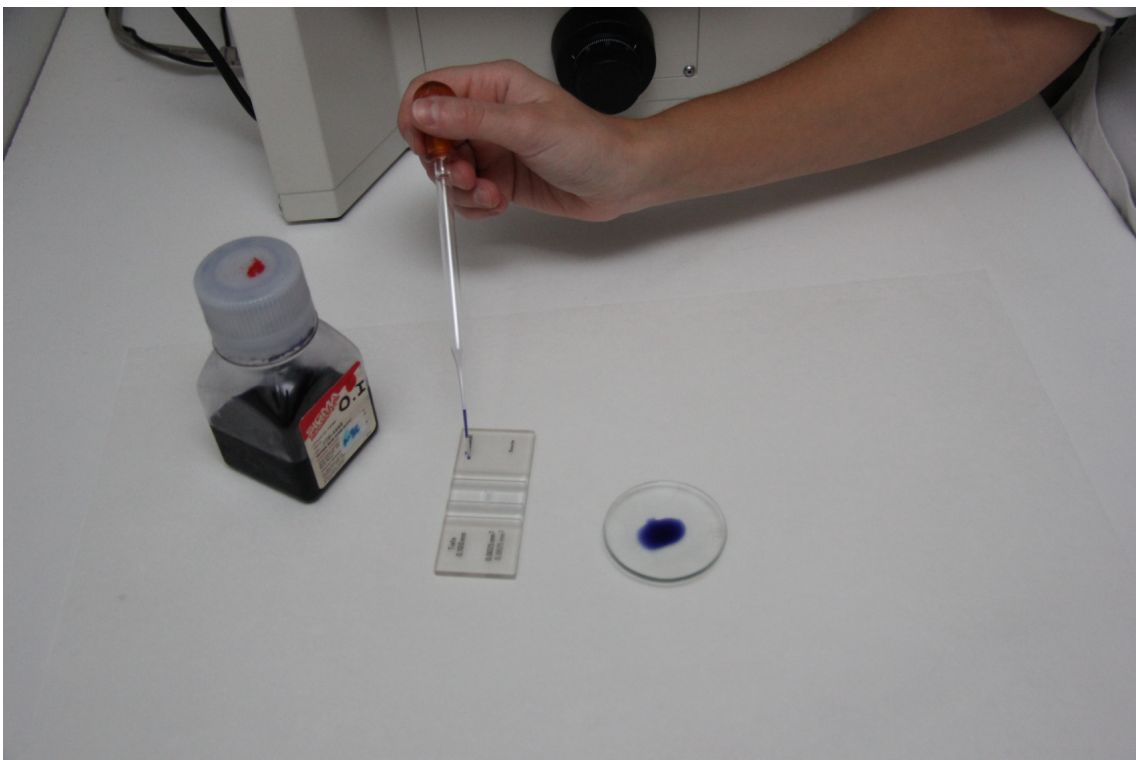
*Fig 1: Técnica de cultivo celular en placa multipocillo*



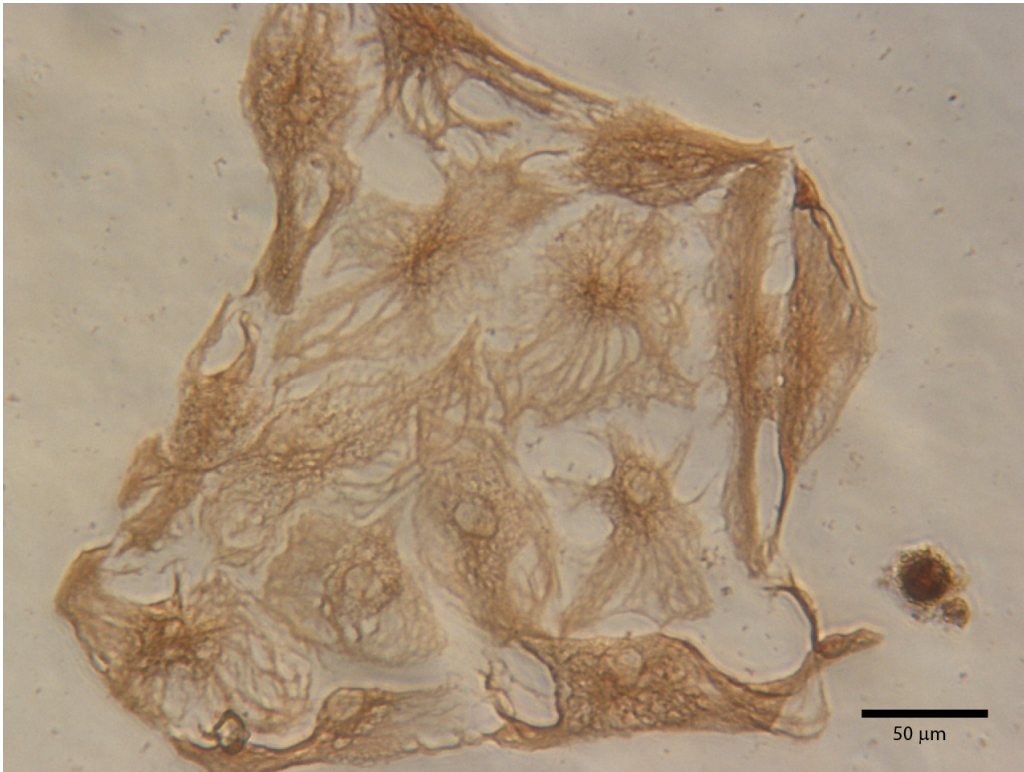
*Fig 2: Técnica de disección de muestras para cultivo celular*



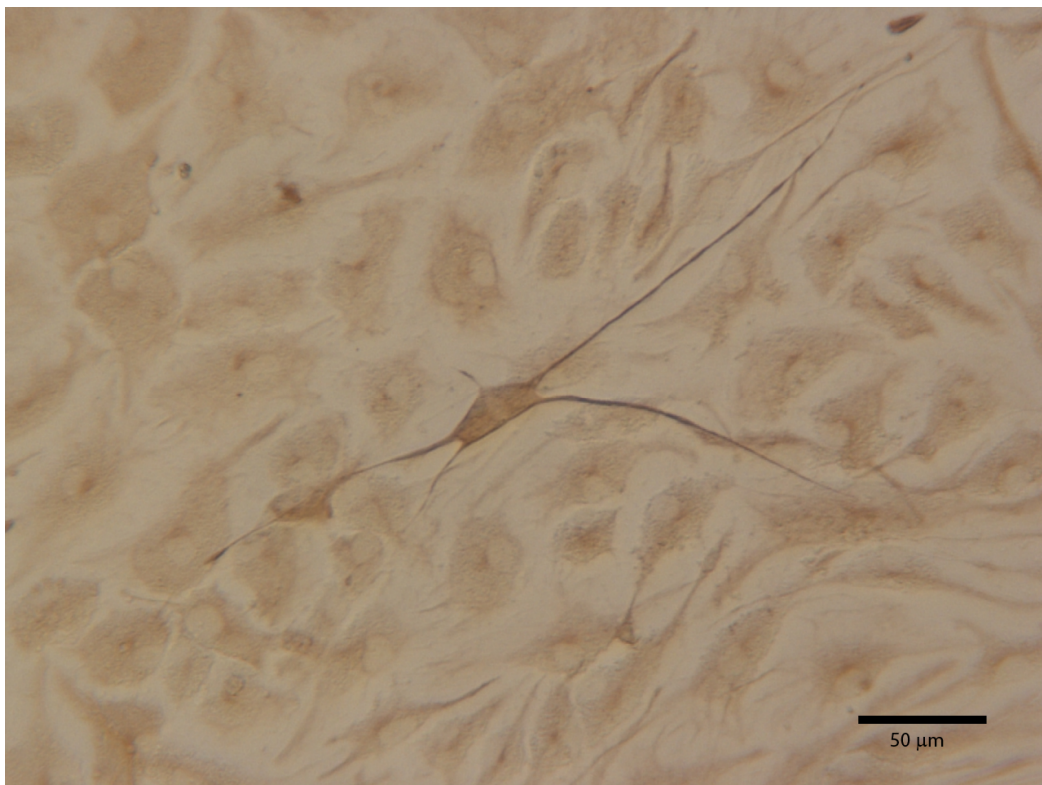
*Fig 3: Microscopio invertido para el estudio de cultivos celulares*



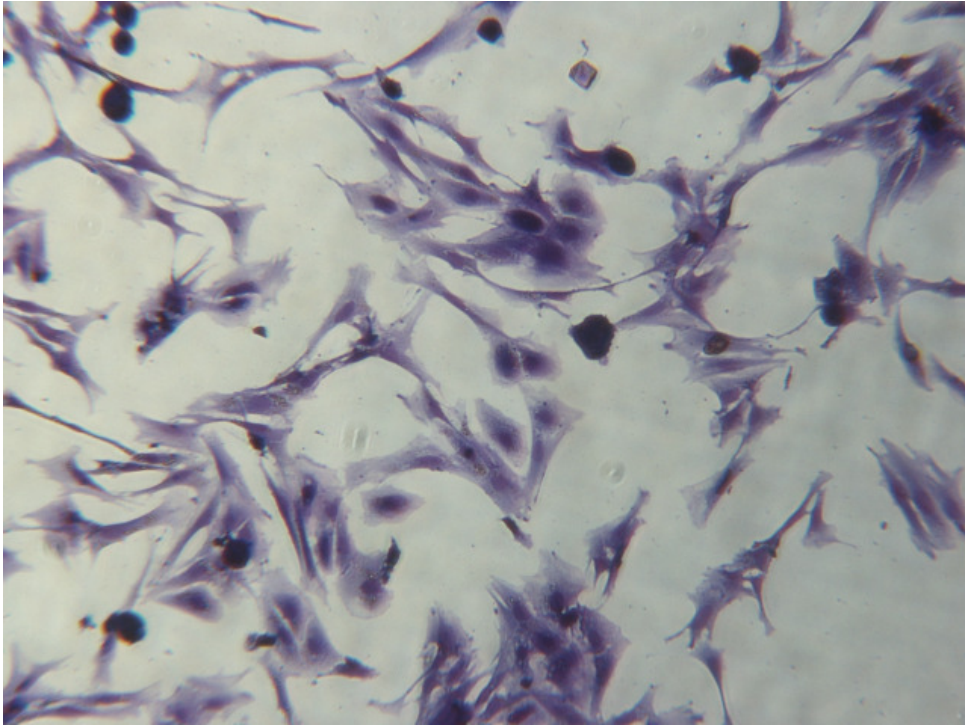
*Fig 4: Tinción vital con Azul Tripán para el recuento celular en cámara de Neubauer*



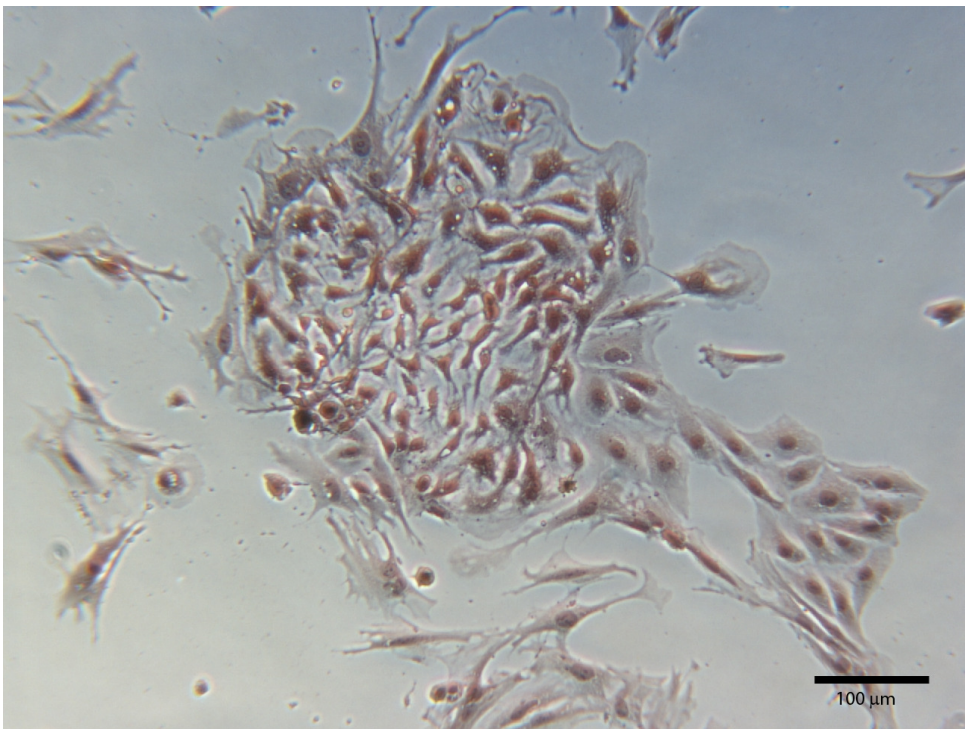
*Fig 5: Cultivo de células epiteliales de riñón. Técnica inmucitoquímica para la detección del filamento intermedio vimentina*



*Fig 6: Cultivo de células neurales. Técnica inmucitoquímica para la detección de nestina*

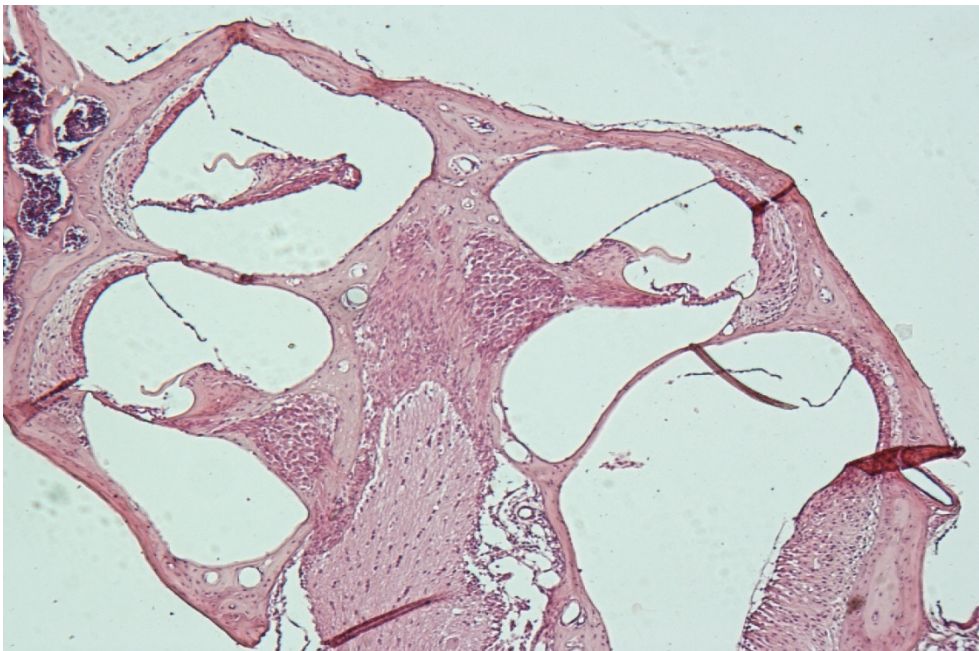


*Fig 7: Cultivo de células epiteliales de pulmón. Técnica de tinción simple con Violeta de Cresilo*

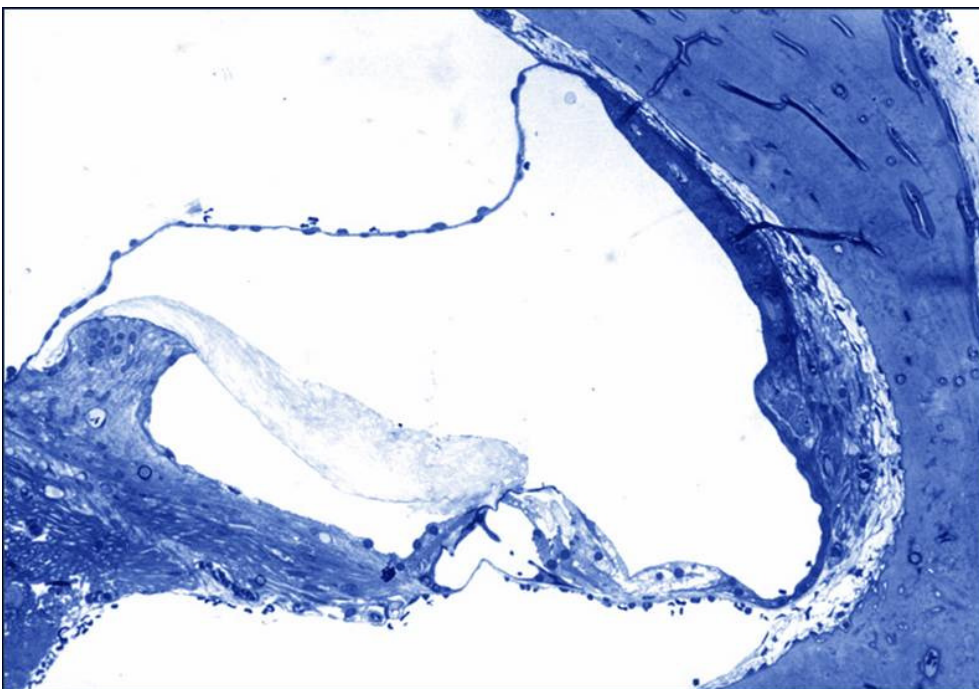


*Fig 8: Cultivo de células epiteliales de riñón. Técnica de tinción simple con Hematoxilina-Eosina*

b) Técnicas histológicas y muestras obtenidas



*Fig 9: Corte histológico de cóclea de rata. Tinción simple con Hematoxilina*



*Fig 10: Corte histológico de cóclea de rata. Tinción simple con Azules de Richardson*