



Biología Celular e Histología



Prácticas de Biología Celular

- **Cultivos celulares y Procesamiento de tejidos.**
- **Suspensiones celulares.**
- **Inmunodetección directa.**
- **Identificación celular tras cultivo.**
- **Manejo del microscopio óptico.**

RESUMEN DE LAS PRÁCTICAS

Práctica 1: Introducción a los cultivos celulares y al procesamiento de tejidos.

- Tinciones.
- Cultivo de una línea celular de astrocitos (para inmunodetectar vimentina).
- Preparación de tampón PBS.

Práctica 2: Suspensión celular de bazo: disgregación mecánica, separación de células adherentes y preparaciones por CTC.

- Obtener una suspensión celular de bazo.
- Determinar viabilidad mediante Azul Tripán.
- Cálculo del porcentaje de adherencia.
- Realizar preparaciones por Citocentrifugación (CTC).

Práctica 3: Inmunodetección directa.

- Inmunodetección directa en las obtenidas en la práctica 2.
- Determinar el porcentaje de células adherentes de la práctica 2.

Práctica 4: Inmunodetección indirecta.

- Inmunodetección diferencial de filamentos intermedios (vimentina) en las células crecidas en portaobjetos de la práctica 1.
- Contratinción con Azul de Toluidina.

Práctica 5: Manejo del microscopio óptico

- Observación e interpretación de las preparaciones realizadas.

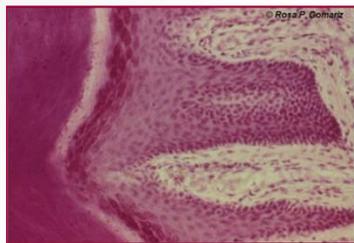
Fijación de las células

La inmunodetección consiste en detectar y localizar antígenos utilizando anticuerpos que los reconozcan específicamente. La fijación es esencial para observar el tejido de la manera más parecida a la realidad, evitando su descomposición o alteración.

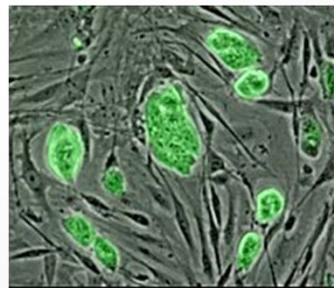
El proceso de fijación tiene que

- Inmovilizar el antígeno sin modificarlo.
- Mantener la estructura celular.
- Permitir un buen acceso al anticuerpo.

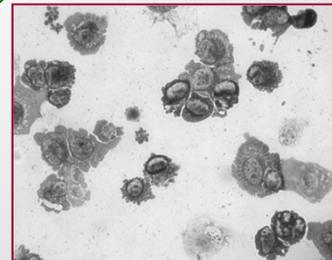
Tipos de muestras celulares



Tejidos



Cultivos celulares



Suspensiones celulares



"in toto"

Métodos de fijación.

Para preservar la antigenicidad es preferible utilizar fijadores de tipo precipitante, ya que los entrecruzantes son mejores para la conservación morfológica.

➤ **Acetona o metanol o etanol 96°.**

Precipitantes. Fijan permeabilizando membranas.

Células en cultivo o extensiones de muestras citológicas.

Cortes en criostato.

➤ **Formaldehído 3,7% en PBS o Paraformaldehído al 4% en PBS.**

Entrecruzantes. Fijan sin permeabilizar. Laboratorios de Anatomía Patológica.

➤ **Fijador de Bouin.**

Mezcla de entrecruzante y dos precipitantes.

➤ **Glutaraldehído.**

➤ **Mezclas de tipo Karnovsky.**

➤ **Tetraóxido de osmio.**

Microscopía electrónica.

Inmunodetección.

La inmunodetección consiste en detectar mediante el uso de anticuerpos específicos un componente celular.

Definir términos:

Antígeno: molécula que provoca una respuesta inmunitaria.

Epítipo o determinante antigénico: región/es del Ag que es reconocida por los Ac y los receptores de los linfocitos.

Especificidad: capacidad de los Ac para discriminar entre Ag.

Afinidad: intensidad de la unión entre el Ac y el Ag.

Reacción cruzada: interacción inespecífica de un Ac con un Ag distinto del que debería reconocer.

Sensibilidad: cantidad mínima de Ag que se puede detectar con una técnica determinada.

Anticuerpos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas generadas por los linfocitos B como parte de la respuesta inmune humoral. Reconocen específicamente la molécula que ha inducido su producción (antígeno).

Cada rectángulo representa un dominio de la IgG:

2 cadenas pesadas.

2 cadenas ligeras.

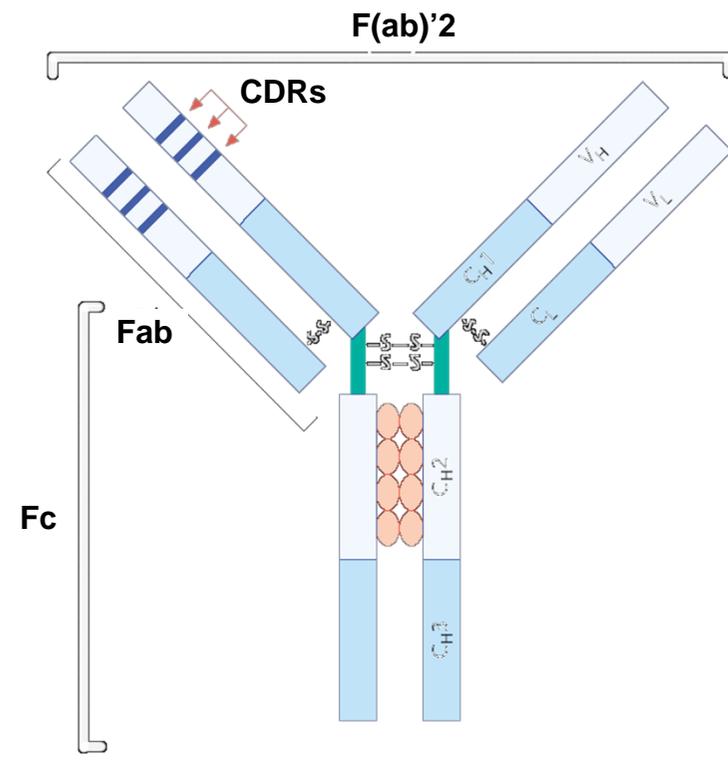
 enlace N-glicosídico

 puente disulfuro

REGIONES:

- **CDR:** Regiones determinantes de la complementariedad.
- **Fab:** Fragmentos de unión con antígeno (antigen-binding).
- **Fc:** Fragmento cristalino (constante).

ESTRUCTURA DEL ANTICUERPO



Inmunodetección

Tipos de anticuerpos



Los **anticuerpos policlonales** reconocen varios epítopos de un mismo antígeno

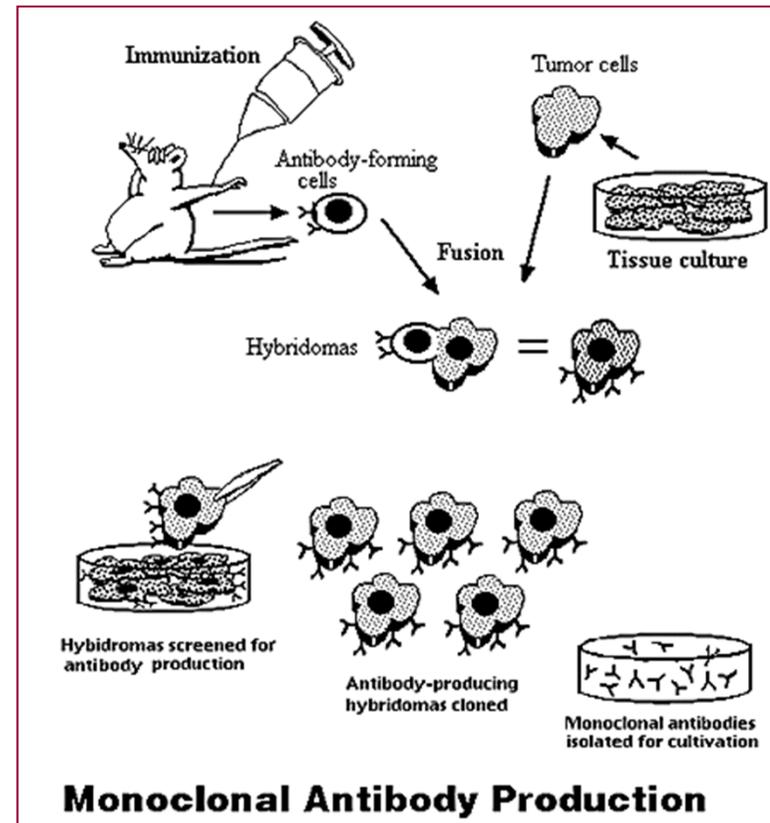
Ventajas: mayor espectro de reactividad, intensidad de señal elevada, más baratos.

Problema: más probabilidad de reacciones cruzadas, producen algo de fondo.

Inmunodetección

Tipos de anticuerpos

Anticuerpos monoclonales



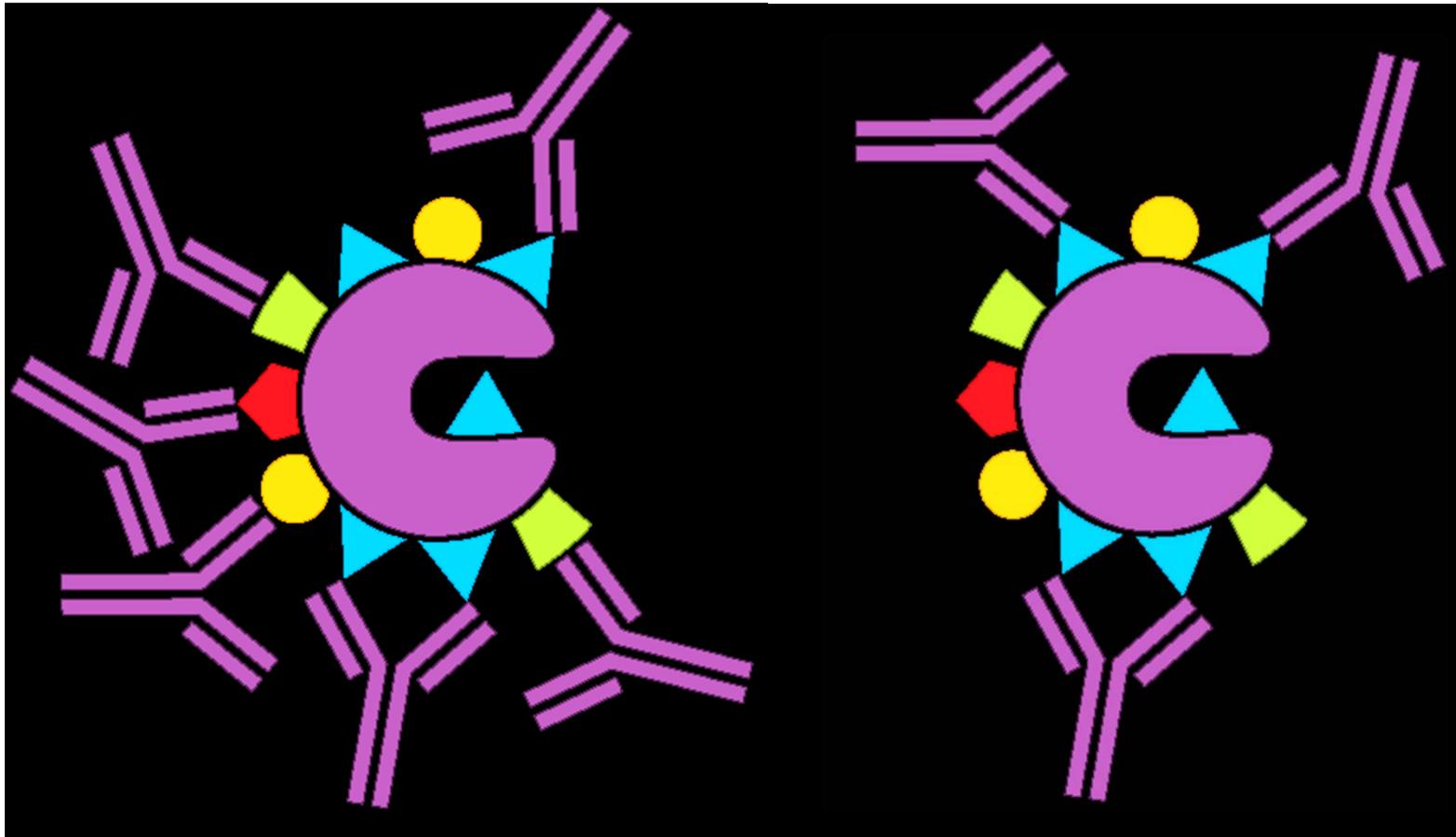
Los **anticuerpos monoclonales** reconocen un solo epítipo.

Ventaja: gran especificidad, producen menos fondo.

Problema: técnica puede alterar ese epítipo y enmascararlo. Son más caros y la concentración de trabajo suele ser mayor.

Inmunodetección

Tipos de anticuerpos



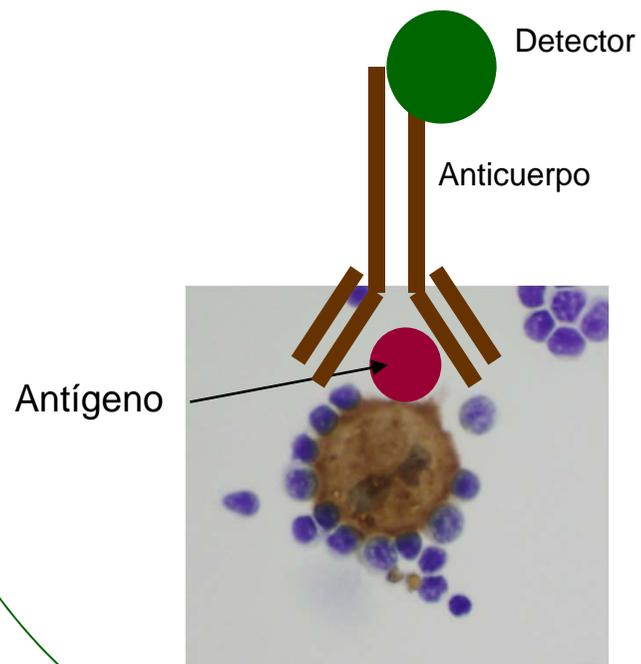
**Anticuerpos
Policlonales**

**Anticuerpos
Monoclonales**

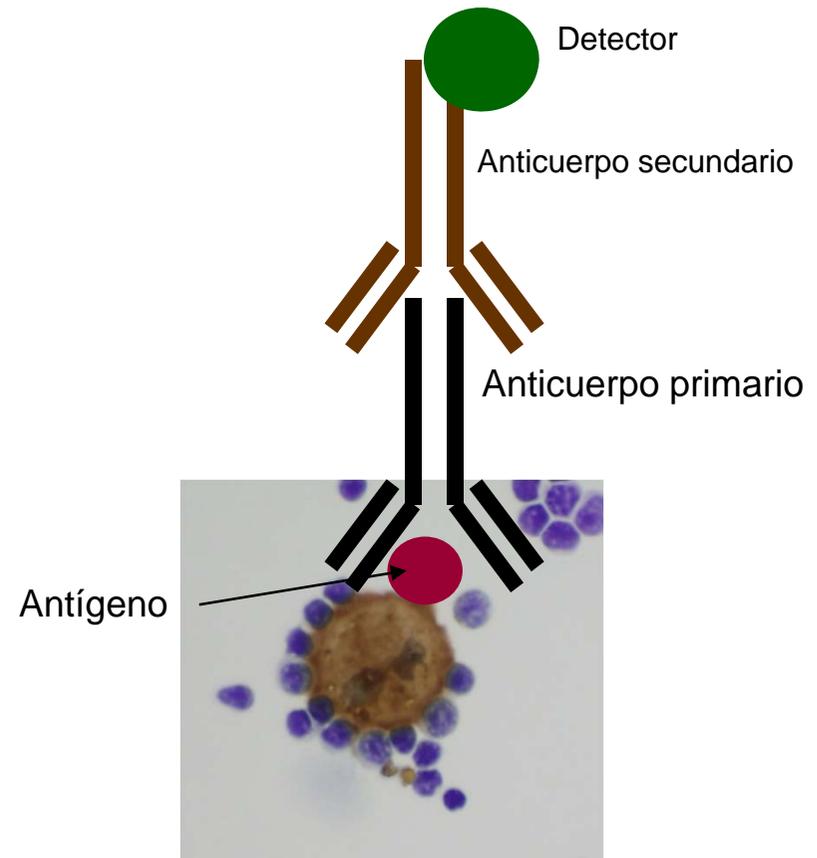
Inmunodetección

Tipos de inmunodetecciones

Inmunodetección directa



Inmunodetección indirecta



Inmunodetección

Tipos de marcadores.

Fluorocromos.

Técnicas de inmunofluorescencia.

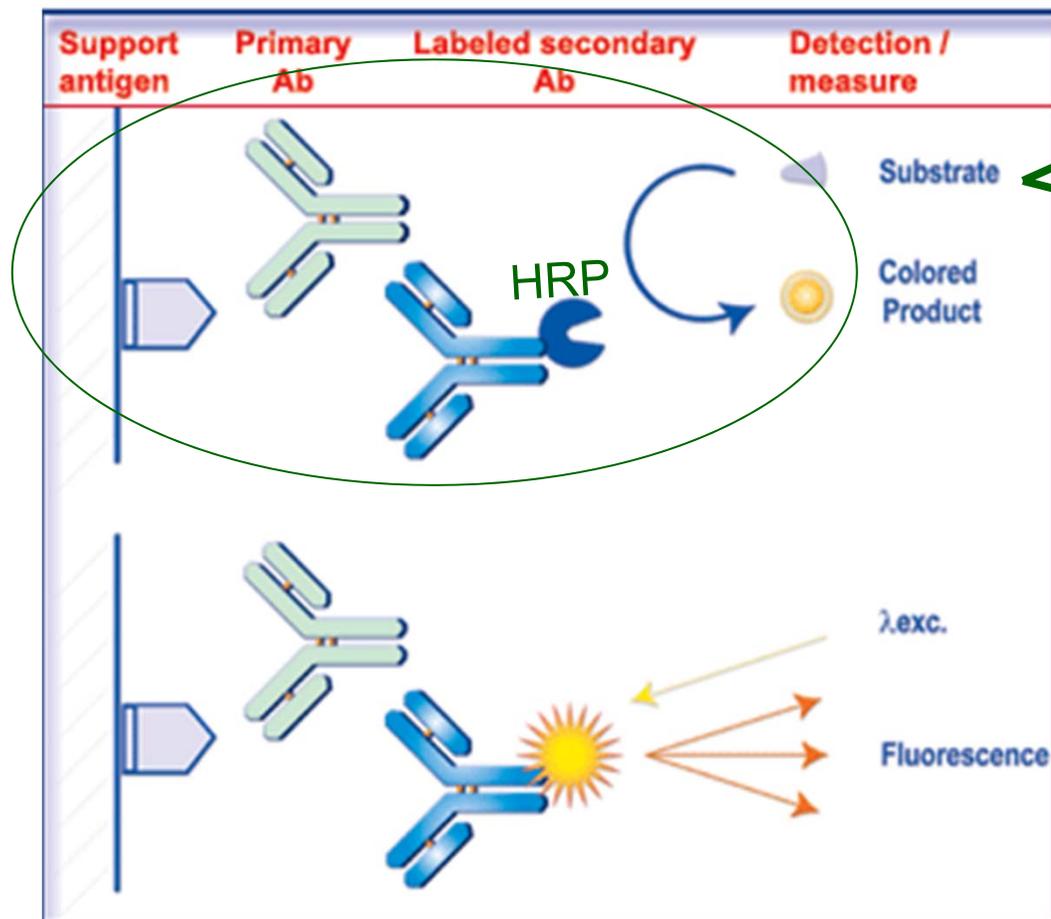
Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Ex-Max (nm)	Excitation Laser Line (nm)*	Em-Max (nm)
BD Horizon™ V450	Blue	404	405, 407	448
Pacific Blue™	Blue	401	405, 407	452
BD Horizon™ V500	Green	415	405, 407	500
AmCyan	Green	457	405, 407	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578
PE-Texas Red®	Orange	496, 564	488, 532, 561	615
Texas Red®	Orange	595	595	615
APC†	Red	650	595, 633, 635, 640, 647	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	595, 633, 635, 640, 647	668
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785
APC-Cy7	Infrared	650	595, 633, 635, 640, 647	785
BD APC-H7	Infrared	650	595, 633, 635, 640, 647	785

Inmunodetección

Tipos de marcadores.

Enzimas.

Técnicas inmunoenzimáticas: peroxidasa (HRP) y fosfatasa alcalina.



HRP: DAB o TMP.

Fosfatasa alcalina: NBT y BCIP.

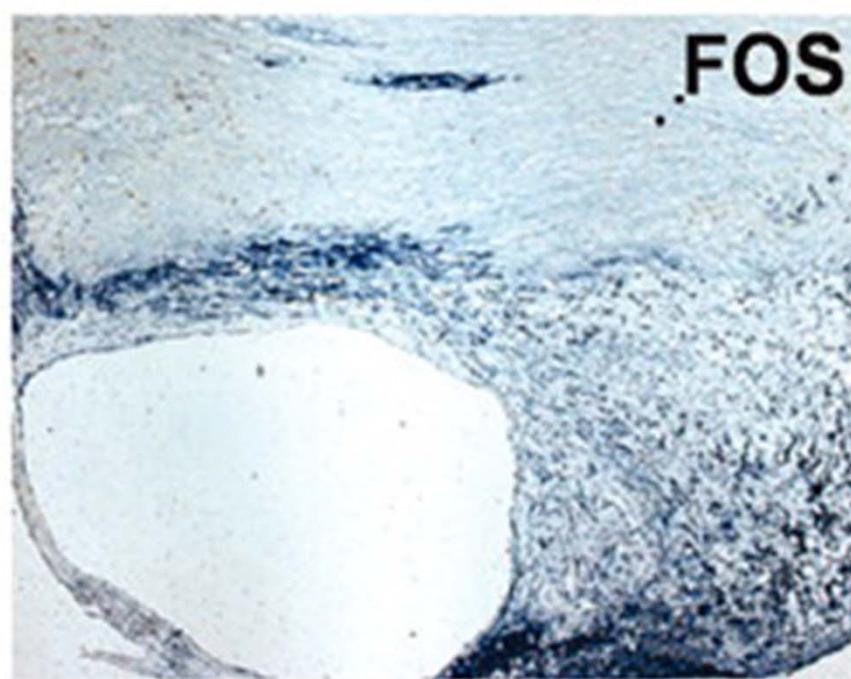
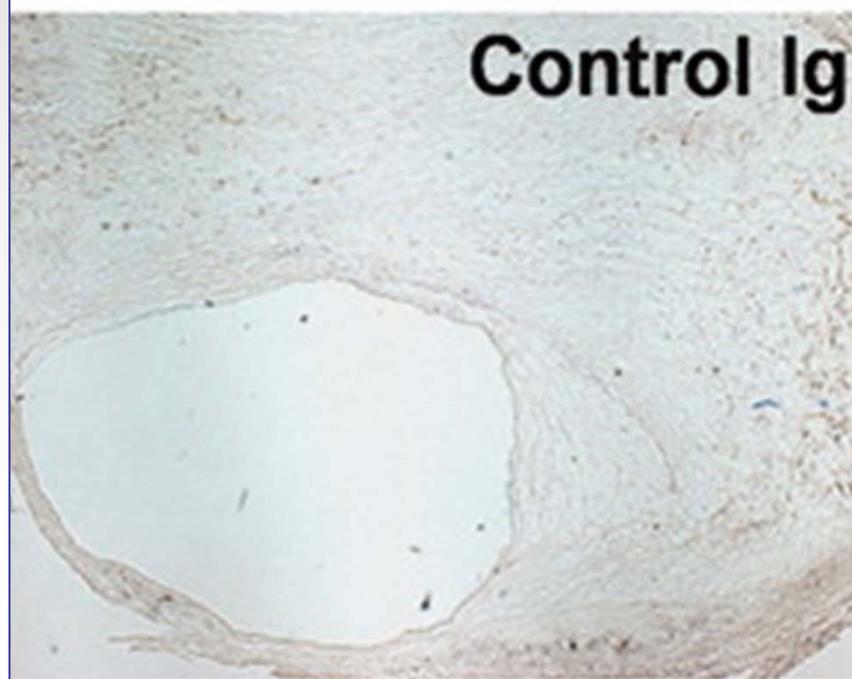
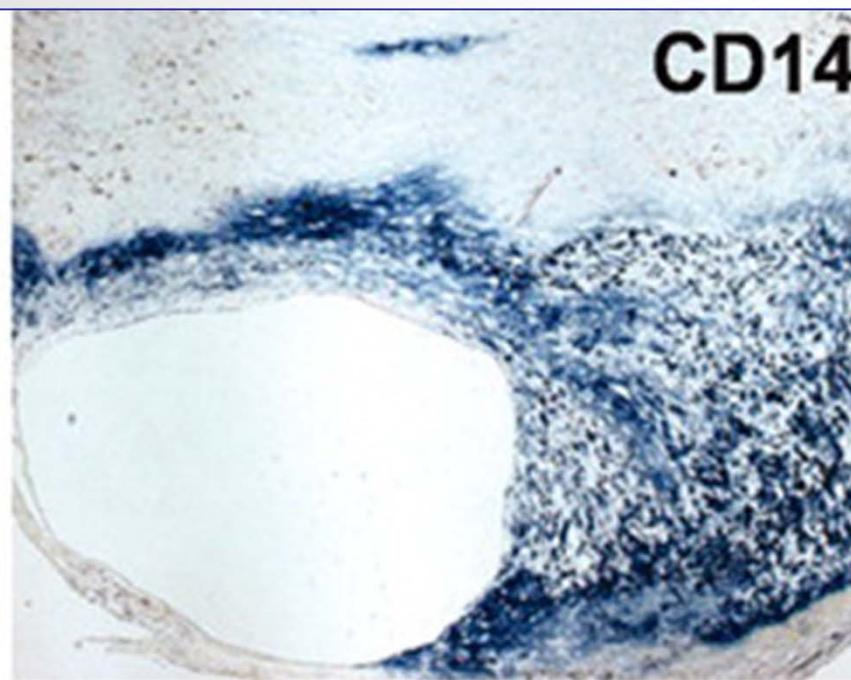
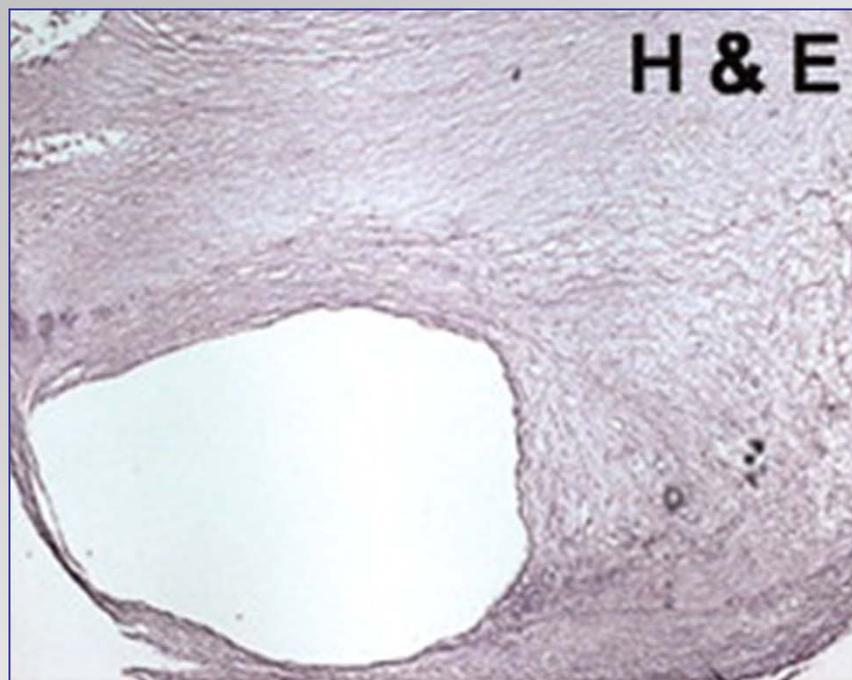
Inmunodetección

Controles

- ▶ Interacciones electrostáticas...
 - ▶ Preincubar la muestra con suero normal a concentración alta (1:30).
 - ▶ O bloquear uniones inespecíficas con BSA.
 - ▶ O añadir detergente a soluciones de lavado.

- ▶ Control positivo: usando cél./tejidos que expresan el Ag a detectar.

- ▶ Controles negativos:
 - Revelado sin pasos previos (presencia endógena de enzima).
 - No poner anticuerpo primario y poner suero no inmune.
 - No poner anticuerpo secundario o complejos de revelado.

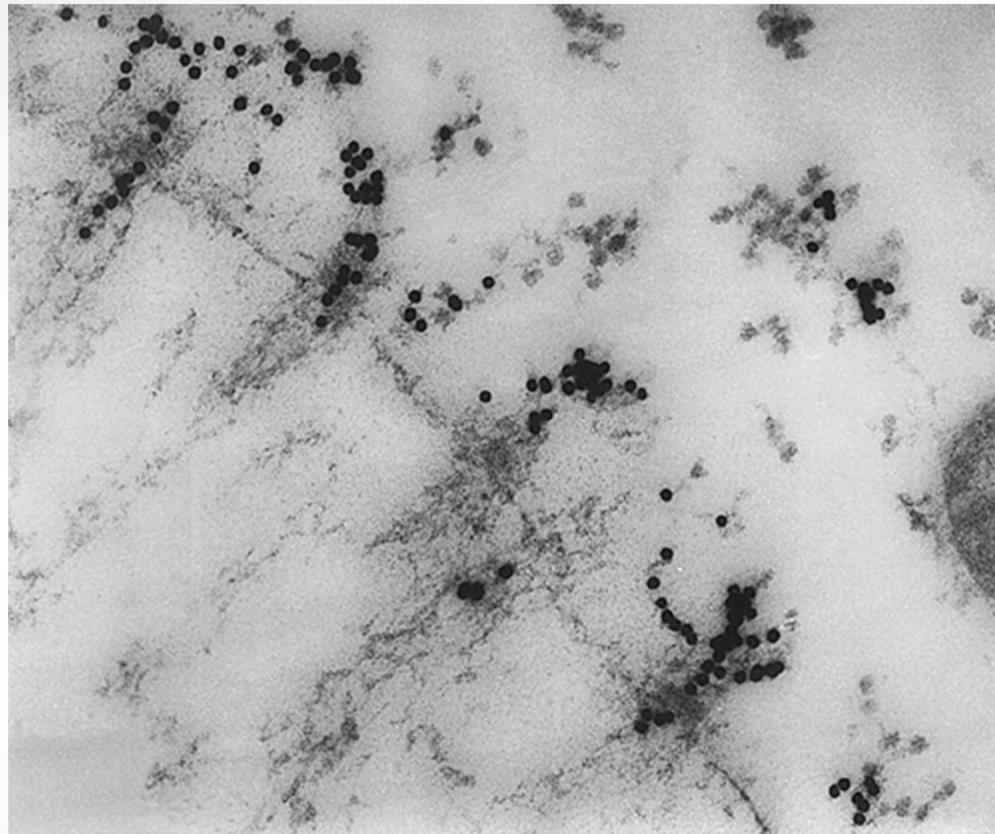


Inmunodetección

Tipos de marcadores.

Oro coloidal.

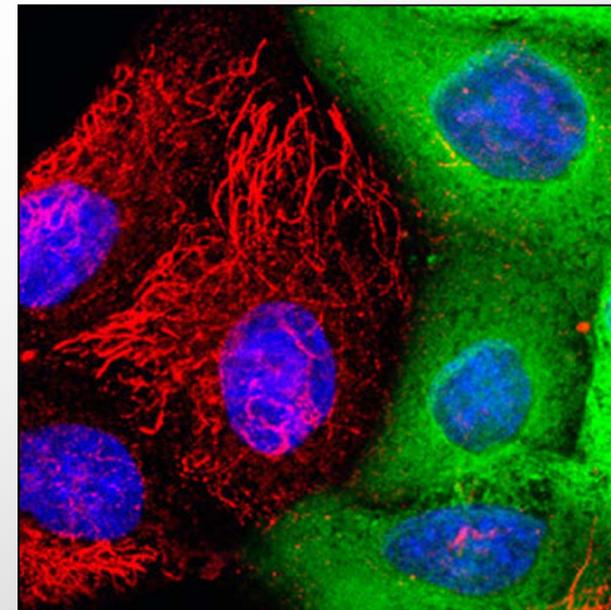
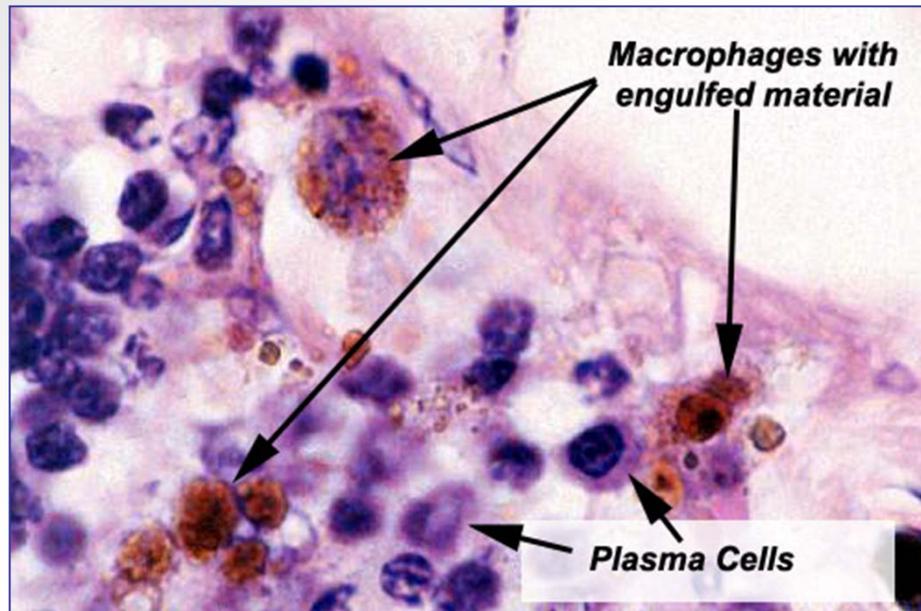
Partículas densas a los electrones: localización ultraestructural de antígenos.



Detección de subpoblaciones celulares mediante inmunodetección

Con la inmunodetección directa o indirecta podemos detectar proteínas de superficie o intracelulares en cortes de tejidos, células en cultivo o suspensiones celulares, valorar si expresan más o menos dependiendo de las condiciones de esas células, estudiar su localización celular, etc.

Otra utilidad es poder distinguir un tipo celular específico en una suspensión celular con varias subpoblaciones celulares, utilizando para ello marcadores de superficie o intracelulares específicos de cada subpoblación celular.



En nuestro caso:

Tinción Específica (inmunotinción), para detectar moléculas de IgG en las células del bazo de ratón.

La IgG se expresa en la membrana de un tipo de linfocitos B y es segregada por las células plasmáticas.

- **Inmunorreacción**: se lleva a cabo utilizando un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón, desarrollado en cabra, que se unirá específicamente a la molécula diana de IgG.

- **Localización de la reacción Ac-IgG**: el Ac elegido NO está marcado con ningún cromóforo (la reacción no es visible), sino que está conjugado con una enzima (peroxidasa). Al complejo IgG-Ac-Per se añade el sustrato de la enzima (H_2O_2), liberándose O^- . Éste oxida la DAB añadida, aportando color marrón a la reacción, lo que permite localizar las moléculas de IgG.

DAB: Diaminobencidina

-  Peroxidasa
-  Ac anti-IgG
-  IgG

