



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.

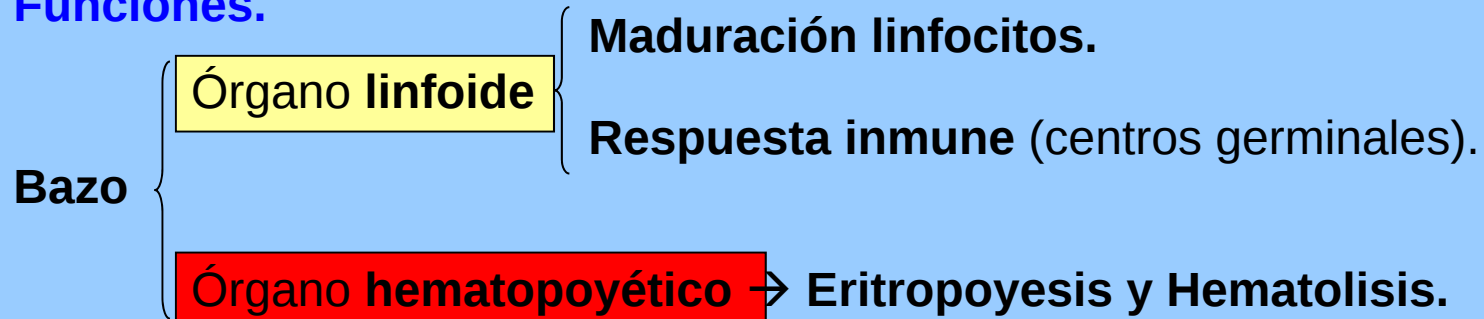
- Inmunodetección diferencial de filamentos intermedios (vimentina) en las células crecidas en portaobjetos de la práctica 1.
- Contratinción con Azul de Toluidina.

Práctica 5: Manejo del microscopio óptico

- Observación e interpretación de las preparaciones realizadas.

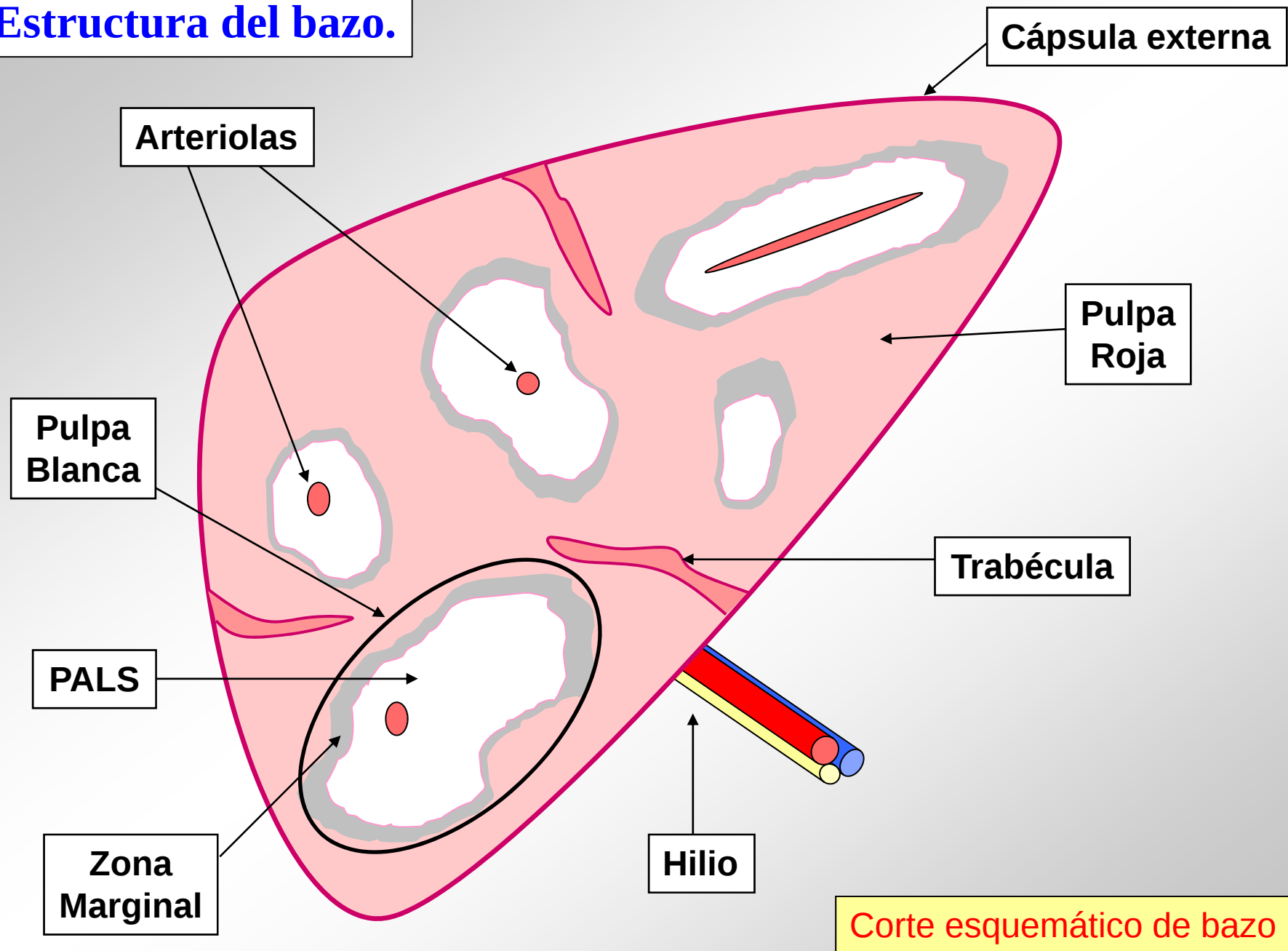
Estructura del bazo.

Funciones.



- A. CÁPSULA externa:** tejido conjuntivo que emite trabéculas al interior.
- B. PULPA BLANCA:** **tejido linfoide** que rodea las arteriolas, con dos áreas:
 - **Vaina linfoide periarteriolar (PALS):** posee **gran cantidad de linfocitos**, algunos macrófagos y células reticulares. También pueden aparecer **centros germinales**.
 - **Zona marginal:** macrófagos y linfocitos menos abundantes.
- C. PULPA ROJA:** espacios vasculares con un elevado número de eritrocitos. Hay macrófagos, algunos linfocitos y células reticulares.
- D. HILIO:** es el haz de entrada de los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios al interior del órgano.

Estructura del bazo.



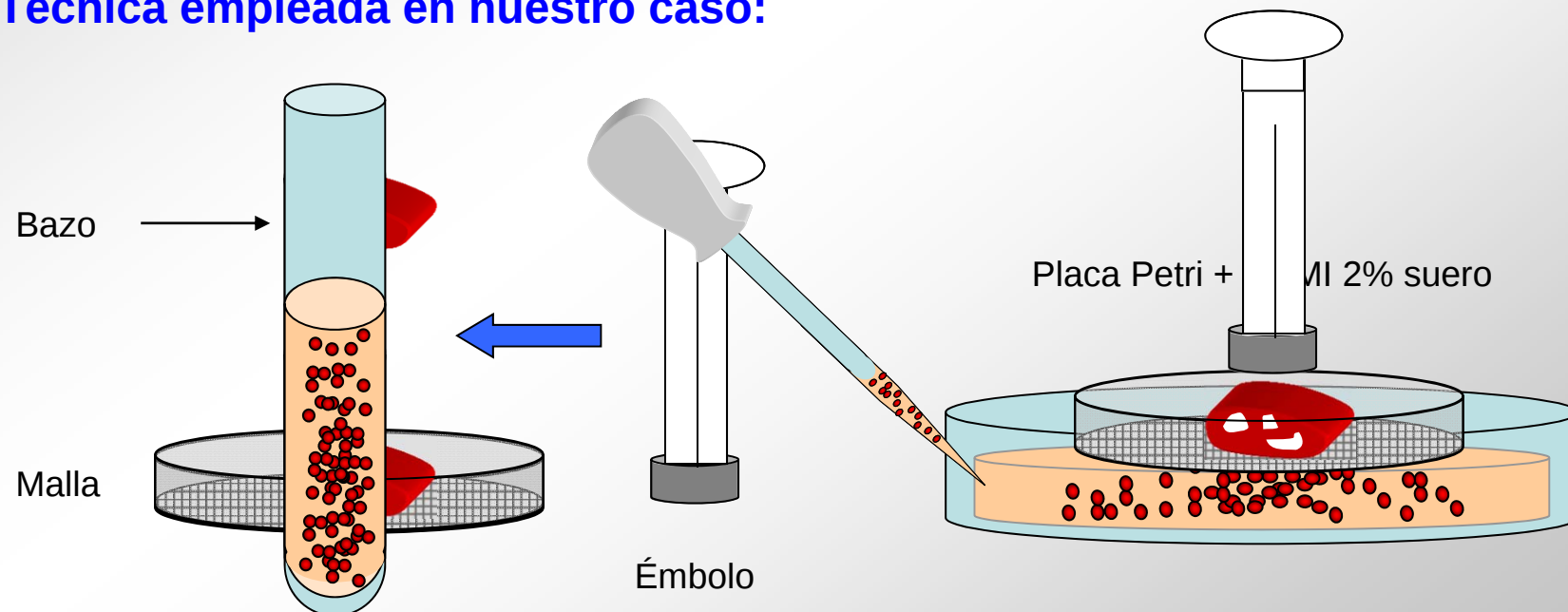
Técnicas a utilizar.

Homogenización de tejidos: consiste en la disgregación del tejido a analizar para obtener una suspensión celular.

Tipos:

- Mecánica (bisturí, tijeras, aguja, potter, malla, etc.)
- Química (EDTA, EGTA, etc.)
- Enzimática (tripsina, pepsina, pronasa, etc.)

Técnica empleada en nuestro caso:

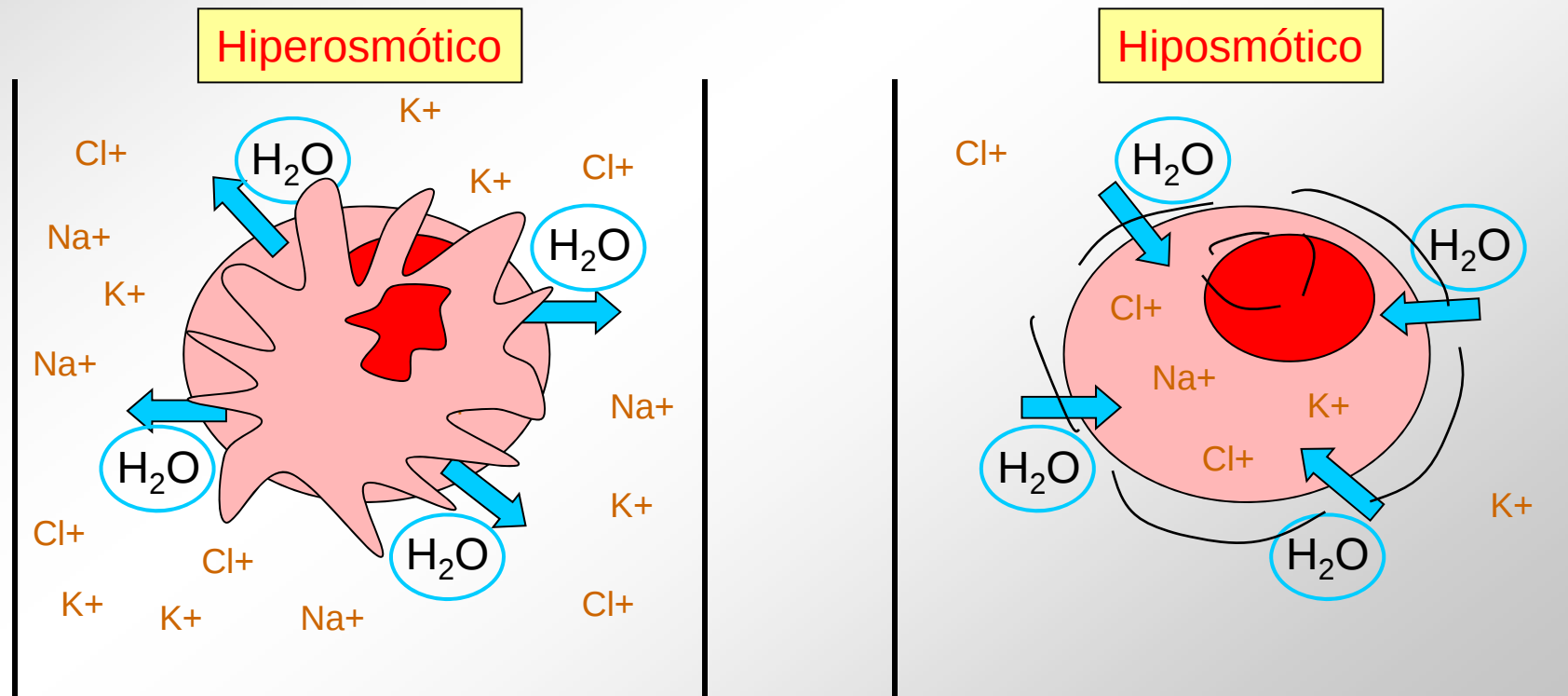


Enriquecimiento celular: aumento en la representatividad de una población celular que se encuentra en baja proporción, dentro de una suspensión heterogénea.

Ejemplos: gradientes de densidad; adherencia celular a plástico, vidrio o lana de nylon y choque osmótico.

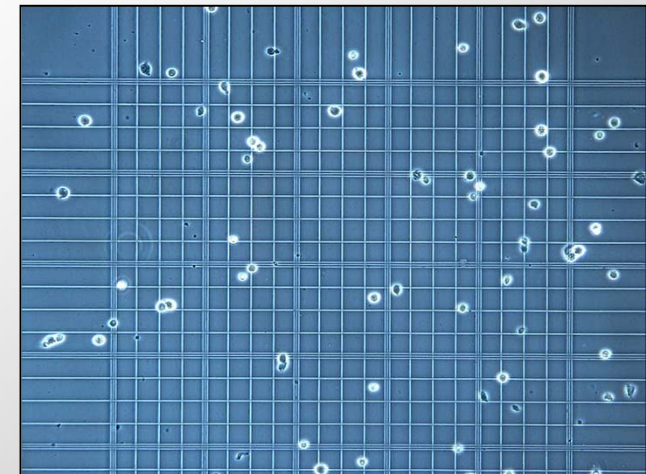
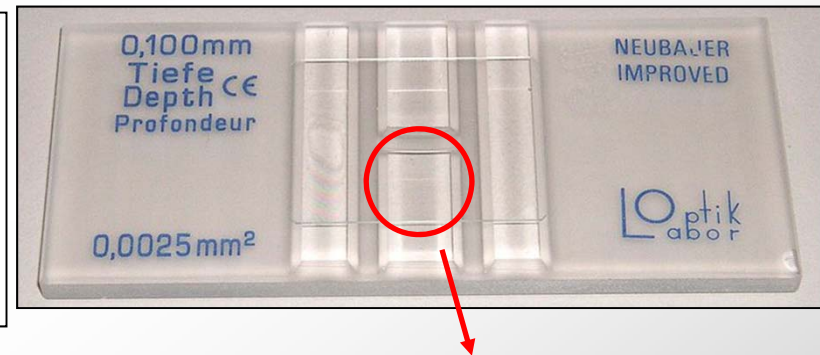
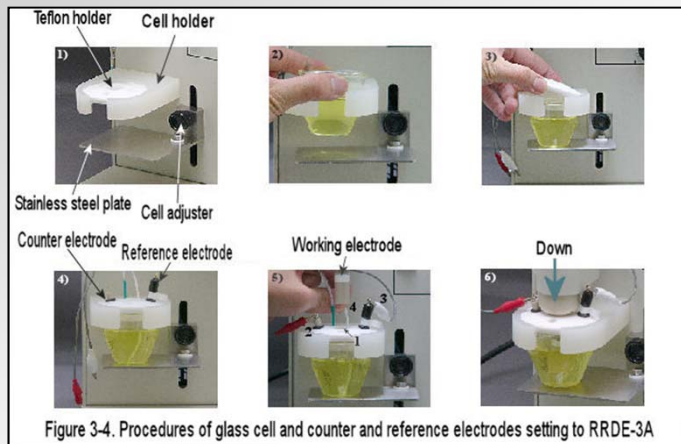
Tipos de choque osmótico:

- Hiperosmótico.
- Hiposmótico.

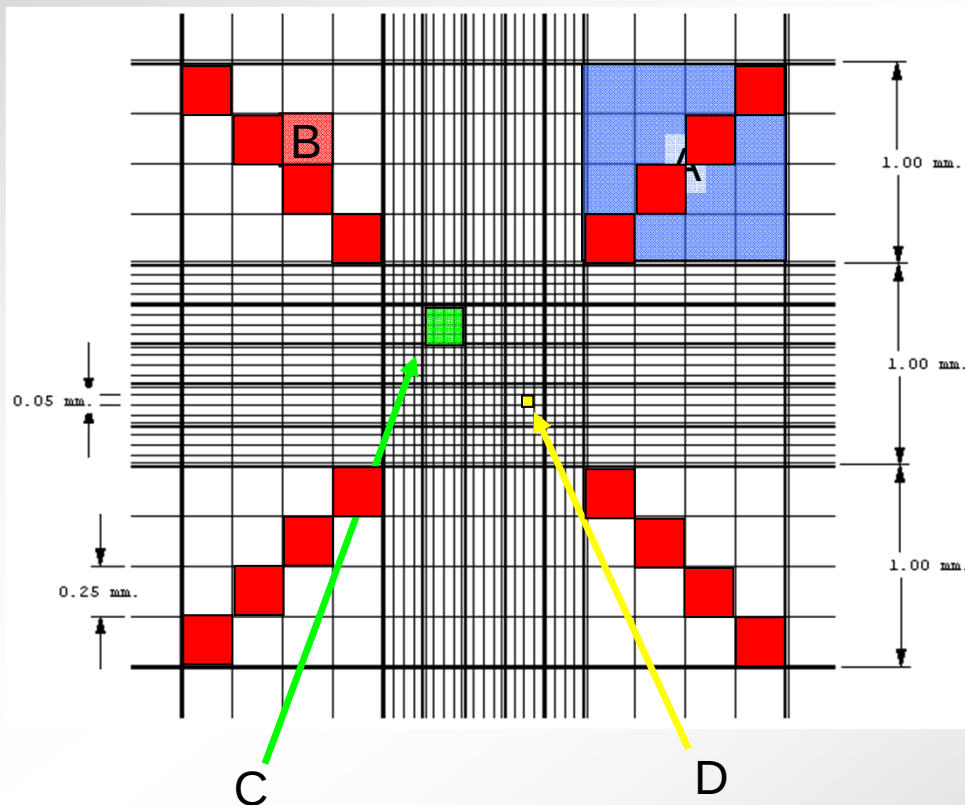
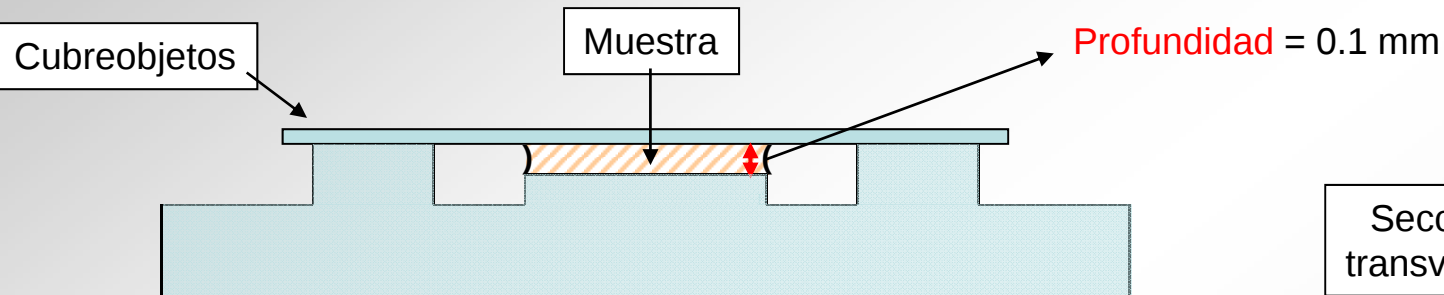


Densidad celular: existen varias formas de calcular el número de células de una suspensión celular.

- Automatizada (citómetro, contador electrónico, etc.)
- Manual (hemocitómetros). El más común es el de Neubauer.



Cámara de Neubauer



En nuestro caso:

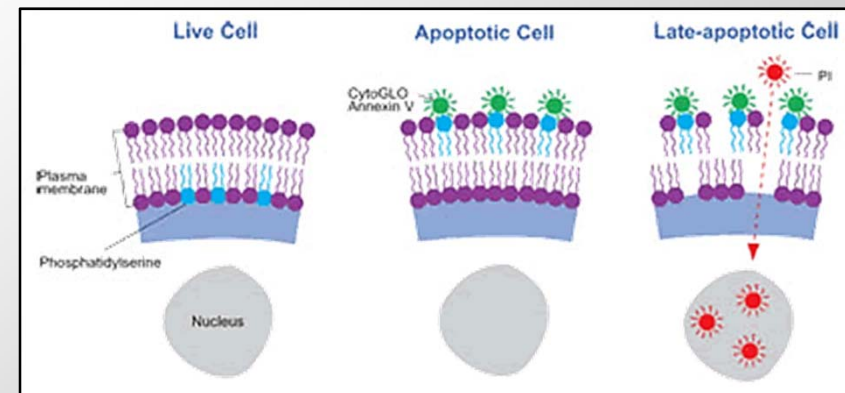
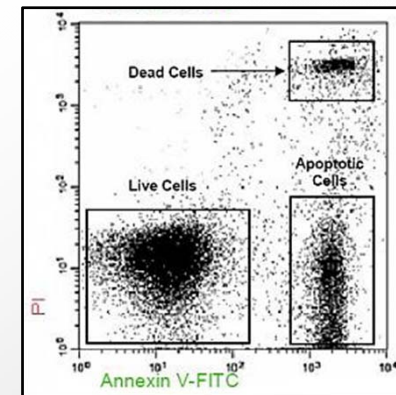
- Contaremos 16 cuadrados de tipo B.
- Repartidos en las 4 diagonales indicadas.

$$N^{\circ} \text{ cél/ml} = \text{Cél. contadas} \times 10000$$

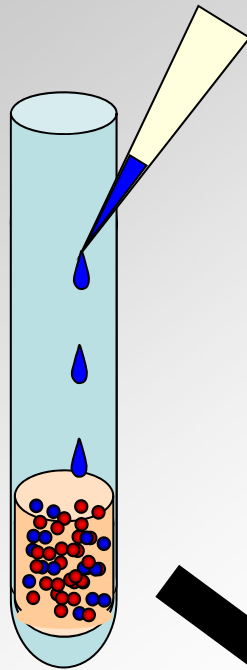
Viabilidad celular: hay diferentes métodos para discriminar la viabilidad celular, empleando bien colorantes, bien fluorocromos.

Dentro de los colorantes, el reactivo más utilizado es el **azul Tripán**, que deriva de la toluidina y que sólo penetra en las células con las membranas plasmáticas dañadas (cél. muertas). Este método sobrestima el número de células viables ya que no penetra en las células en proceso de muerte (apoptóticas).

De los fluorocromos, el más común es el **yoduro de propidio**, junto con la **7AAD**. Ambos se intercalan en el ADN de las células muertas. Generalmente, necesitan un citómetro de flujo para poder ser analizados.

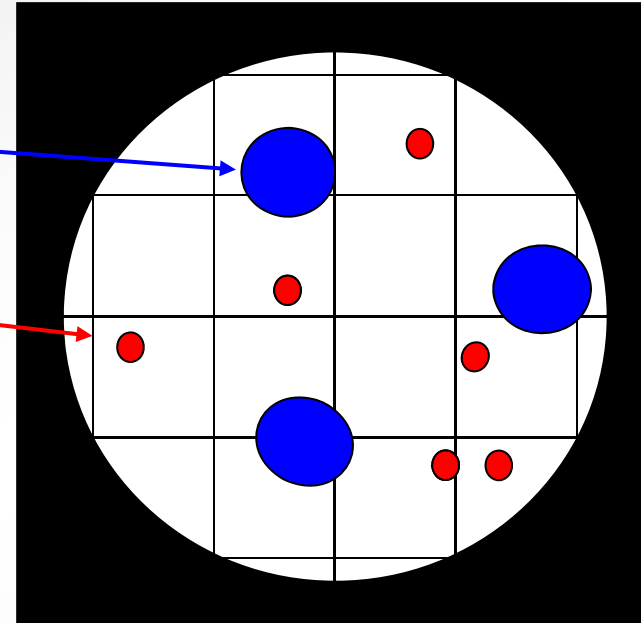


Técnica empleada en nuestro caso:

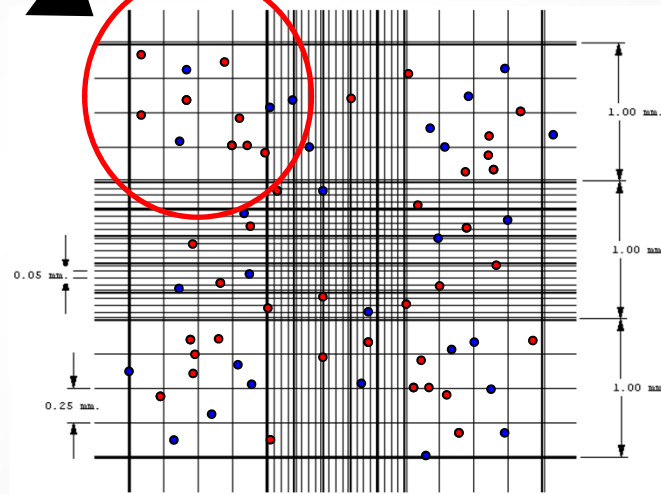


Cél. muerta

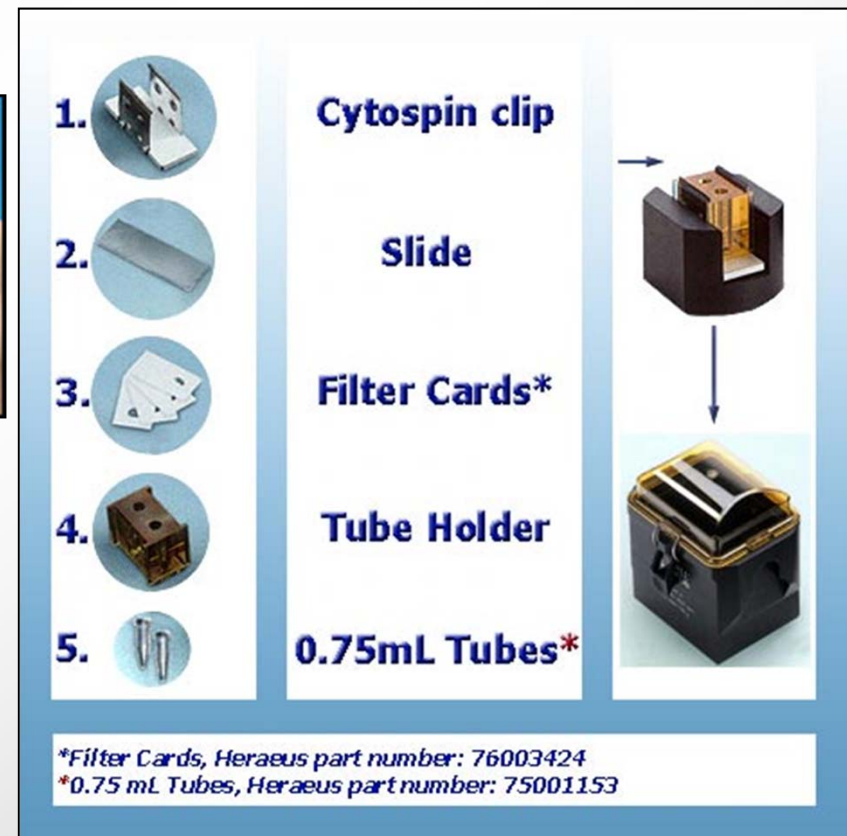
Cél. viable



Calculamos:
% Cél. viables



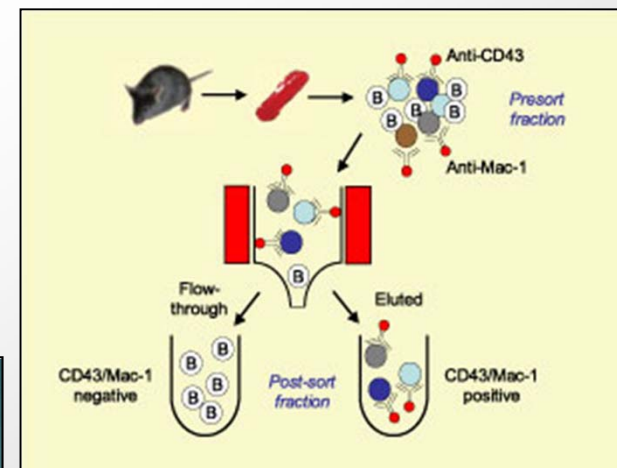
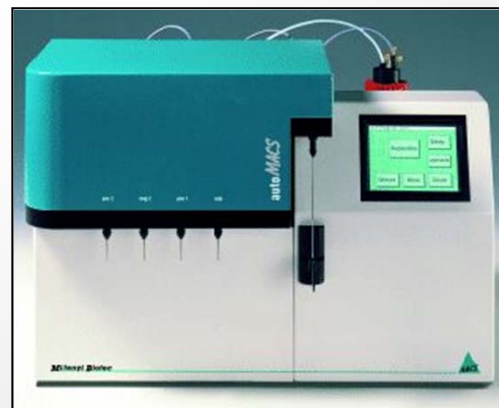
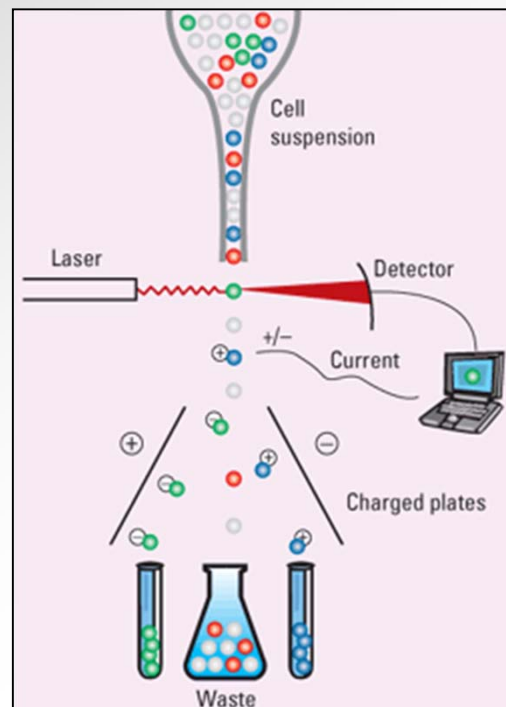
Citocentrifugación: técnica empleada para la realización de tinciones inmunohistoquímicas en células en suspensión. Consiste en la centrifugación de pequeñas alícuotas de células sobre portaobjetos para que queden adheridas formando una monocapa, que permita su estudio posterior. Se emplean adaptadores y rotores especiales, como los que se muestran.



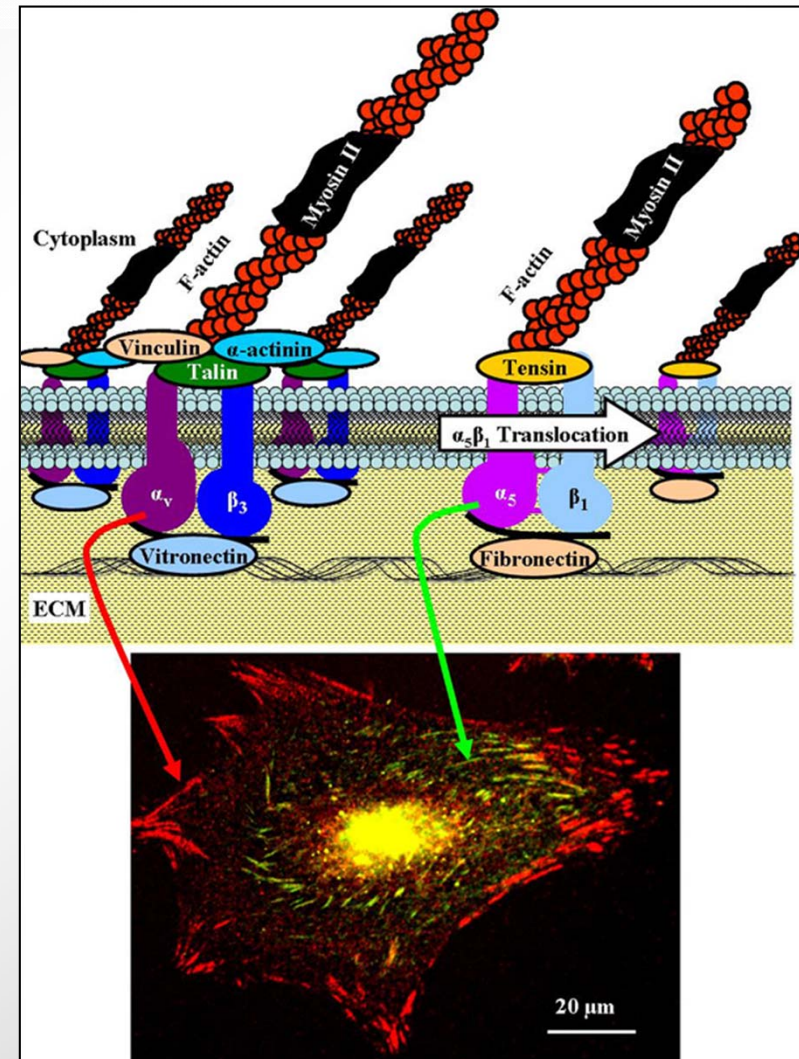
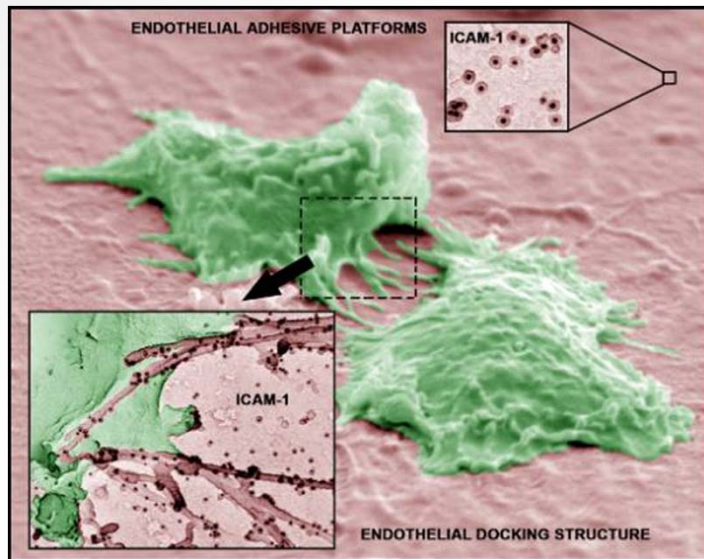
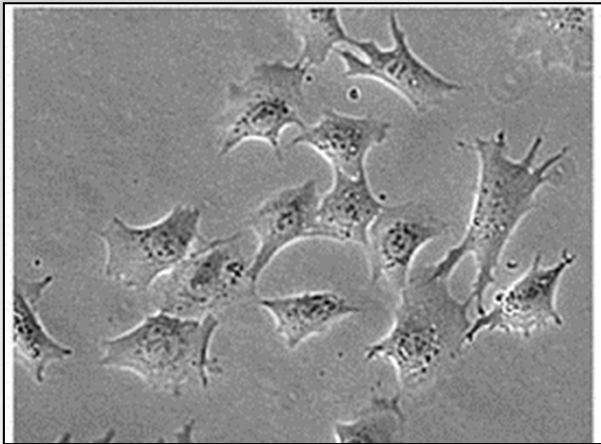
Aislamiento celular: se define como la separación de un tipo celular a partir de una población mixta.

Generalmente se emplean **anticuerpos específicos** que reconocen una población celular concreta en función de los antígenos que expresa.

Este aislamiento se puede realizar mediante **citrometría de flujo**, si los anticuerpos están conjugados a un fluorocromo (empleando un *sorter* o separador celular), o bien mediante **aislamiento magnético**, si el anticuerpo está conjugado con microbolas férricas.

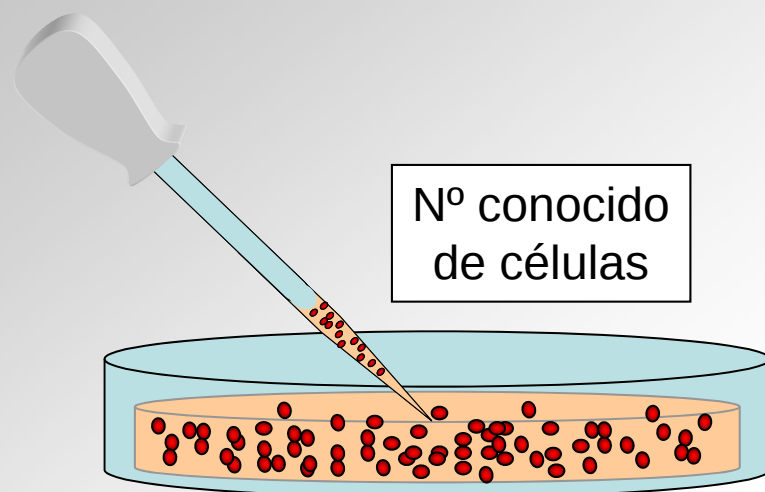


Técnica empleada en nuestro caso: aislamiento por adherencia al plástico.
Se emplean materiales plásticos (poliestireno) con una ligera carga para facilitar la unión.
Ésta se produce por la interacción de las integrinas con el sustrato, formando “adhesiones focales”.



Aislamiento por adherencia a placa:

Incubar a 37°C



**Calculamos:
% Células
adheridas**

Sobrenadante

