



## 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.**

## **NORMAS GENERALES DE LABORATORIO**

- Se trabajará en equipos de **2-3 personas**.
- Cada alumno es responsable del **mantenimiento** y **limpieza** del material de laboratorio que se pone a su disposición.
- Al terminar cada práctica los puestos de trabajo deberán dejarse con todo el material **LIMPIO** (lavado con jabón y aclarado con agua destilada) y **SECO**. El papel de filtro sobre el que se trabaja deberá cambiarse.
- Antes de utilizar las **pipetas automáticas**, comprobar bien el **rango de volumen** que se puede coger con esa pipeta y **NUNCA SOBREPASARLO**. También se deben elegir las puntas para las pipetas de acuerdo con ese rango de volumen (mirar tabla del guión).
- Cuando se utilicen **microscopios**, se dejarán **apagados**, sin desenchufar y con la **funda puesta**.
- Las gradillas con los colorantes y alcoholes, deberán permanecer ordenadas en la mesa correspondiente.
- Los frascos que contienen el medio de montaje y las cajas de “cubreobjetos” quedarán tapados y en la parte central de las mesas.

## NORMAS PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES

Para realizar una manipulación estéril de los cultivos celulares, hay que tener las siguientes precauciones:

- Todas las manipulaciones de las células se realizarán en la **campana de flujo laminar**.
- Usar *PipetBoy* o **pipetas automáticas**.
- Mantener los recipientes **abiertos el menor tiempo** posible.
- Todo el **material** que se utilice tiene que estar **estéril**, así como las soluciones que se utilicen.
- Con la punta de las pipetas no se debe tocar ninguna superficie para evitar contaminaciones.
- Ante cualquier duda limpiar con alcohol 70% lo que pueda estar contaminado si no es reemplazable, o reemplazarlo si es posible.
- Si se descubre un recipiente contaminado no se debe abrir. Si se han de tomar muestras para su análisis conviene hacerlo en ambiente estéril y después limpiar cuidadosamente el área de trabajo y conectar la iluminación UV.

## GESTIÓN DE RESIDUOS

Para un mejor funcionamiento de los laboratorios, se debe depositar en el recipiente adecuado todos los residuos generados. En las distintas partes del guión se irán describiendo los procedimientos específicos a seguir en cada caso:

- ***Plástico y vidrio con restos biológicos***: se tira al contenedor específico.
- ***Restos de medios de cultivo***: inactivarlos con lejía y posteriormente desechar.
- ***Restos de PBS y tampón de lisis***: desecharlos.
- ***Acetona***: recuperarla en la misma botella
- ***Azul de Toluidina***: Recuperarlo en la misma botella, filtrándolo con un embudo pequeño y un filtro de papel.
- Una vez usada la **DAB, el papel, el plástico y los guantes** se tirarán al contenedor indicado para ello, "**residuos DAB sólidos**".
- Los líquidos contaminados con DAB se recogen en la botella "**residuos líquidos con DAB**", inactivándose con  $\text{KMnO}_4$  3% +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% +  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, en la misma proporción que el volumen de DAB desechado.
- ***Basura general***: los guantes de látex y todo lo que no tenga un recipiente específico, irá en este cubo.

## UTILIZACIÓN DE PIPETAS AUTOMÁTICAS

**Pipetas automáticas:** Pueden ser de volumen fijo o graduable. La parte superior del émbolo tiene tres posiciones. Para coger un volumen exacto, se debe apretar el émbolo hasta la posición intermedia y soltar lentamente. Para descargar, se presiona hasta la posición intermedia. Para descartar el volumen restante se puede apretar hasta el final, pero el volumen liberado ya no será el exacto. Las puntas son desechables, se tiran apretando el botón pequeño situado en el lateral de la pipeta. Son las más usadas ya que permiten trabajar con volúmenes exactos y evitan posibles contaminaciones.



| Pipeta    | Rango de medida  | Tipo de puntas |
|-----------|------------------|----------------|
| Pequeña   | 0.5-10 $\mu$ l   | Blancas        |
| Pequeña   | 2-20 $\mu$ l     | Amarillas      |
| Intemedia | 20-200 $\mu$ l   | Amarillas      |
| Grande    | 100-1000 $\mu$ l | Azules         |

## **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.

# CULTIVOS CELULARES

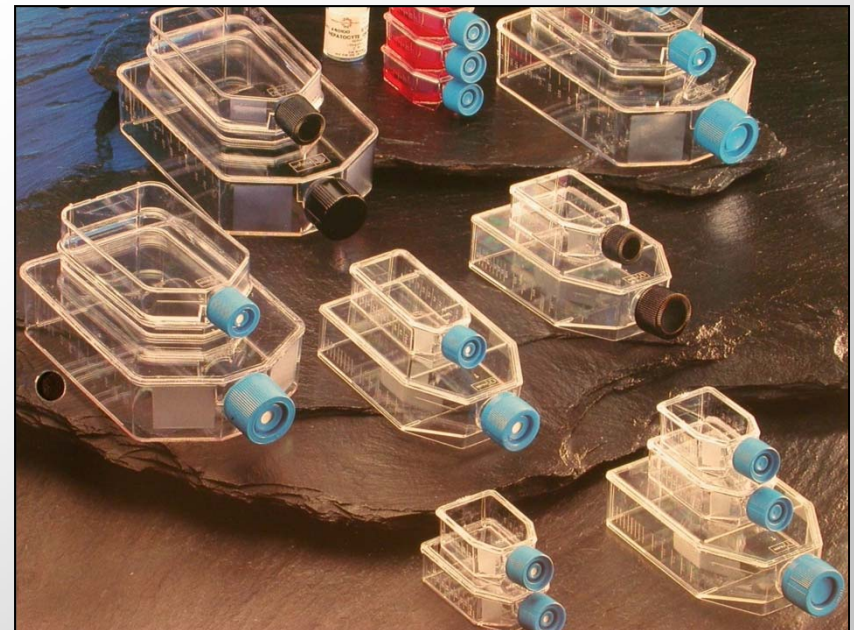
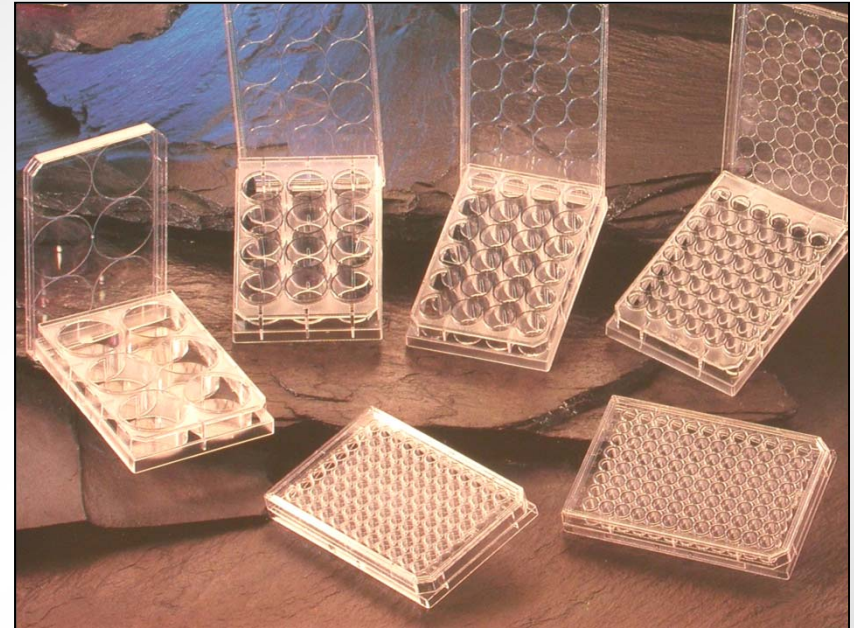
## **Experimentación con células en condiciones absolutamente controladas**

Permite:

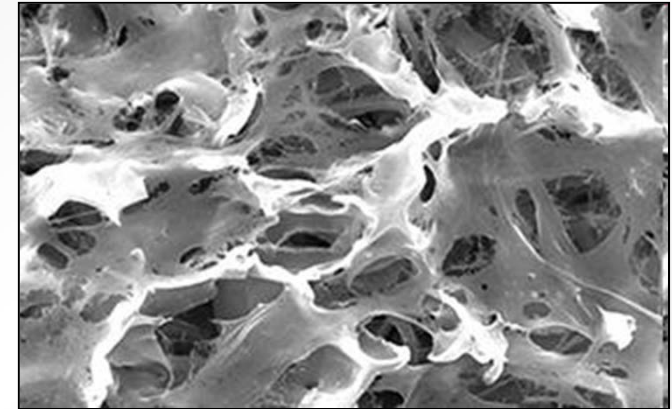
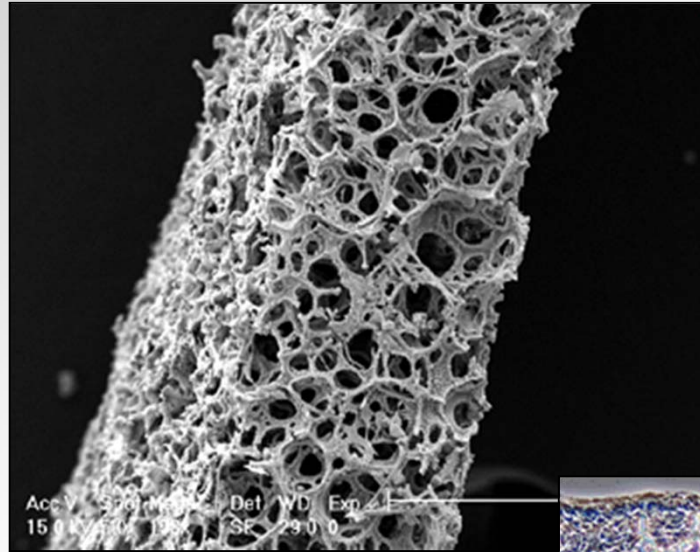
- Analizar interacciones entre varios tipos celulares.
- Estudiar los efectos de adición o eliminación de moléculas.
- Manipulaciones genéticas, etc.

## Soporte de los cultivos

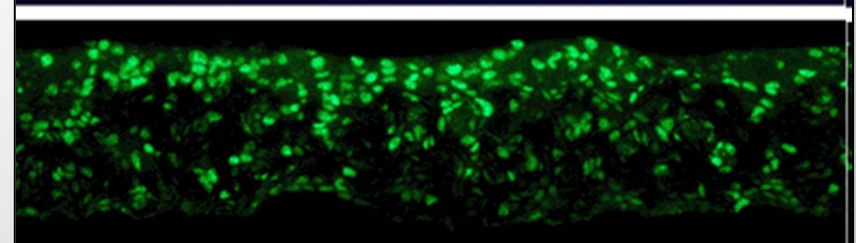
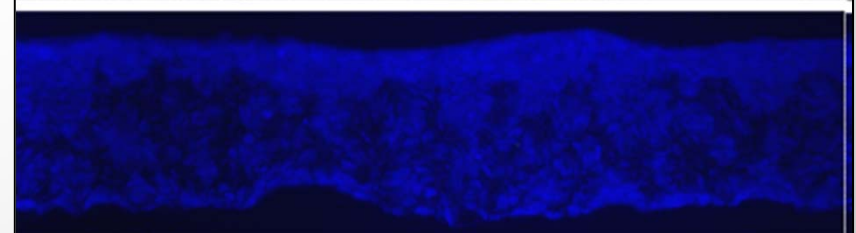
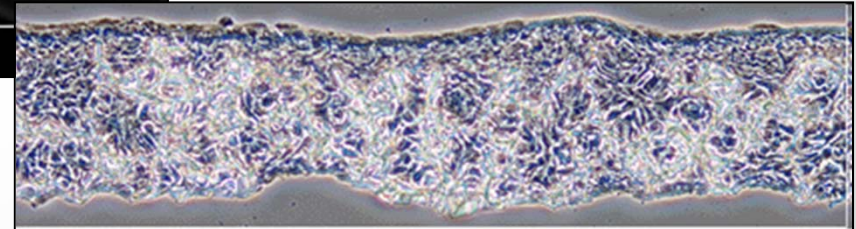
- Vidrio.
- Plástico desechable.



## Superficies tratadas:



- Con fibronectina.
- Con colágeno.
- Monocapas de otros tipos celulares.
- Matrices tridimensionales:
  - \* Geles de colágeno.
  - \* Esponjas artificiales.



## Medios de cultivo:

- Solución tamponada isotónica rica en sales y electrolitos.

### Base:

- Azúcares (glucosa).
- Aminoácidos.
- Sales minerales
- Vitaminas.

### Suplementos:

- Rojo fenol (indicador de pH).
- Antibióticos.
- Suero fetal de ternera (diversos factores de crecimiento).
- Aditivos específicos: Pyr (Piruvato), Glu (Glutamina).



## Mantenimiento de un cultivo

### - Recambio periódico del medio de cultivo:

Eliminación de las sustancias de desecho.

Adición de nutrientes según el consumo.

### - Control de la densidad celular:

Trasvases de células a otros recipientes.

### - Mantenimiento de condiciones físico-químicas favorables:

Temperatura (36.5°-37°C en mamíferos).

Humedad (próxima al 100%).

Balance gaseoso: O<sub>2</sub> (presión atmosférica) y CO<sub>2</sub> (5 %).

pH (entorno a 7).

Osmolaridad.



El **riesgo de contaminación** microbiológica de un cultivo es **muy alto**.

Posibles contaminantes: bacterias, levaduras, micoplasmas y virus.

Utilización de antibióticos y antifúngicos en el medio:

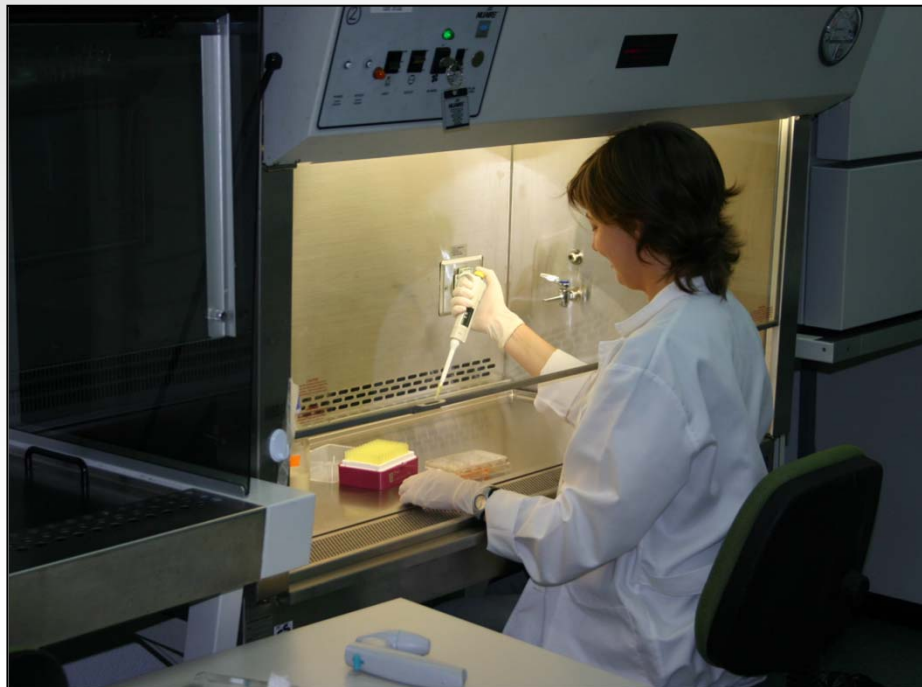
- Penicilina/estreptomicina.
- Penicilina/estreptomicina/fungizona.
- Gentamicina.
- Kanamicina, tylocina, quinolonas.
- Amphotericina-B (antifúngico y antilevaduras).

### **CONDICIONES DE ABSOLUTA ESTERILIDAD**

- Material esterilizado (placas y medios de cultivo, instrumental, etc.).
  - Radiación  $\gamma$  para placas/recipientes de plástico.
  - Calor seco
  - Autoclave
- } para material de disección, vidrio y plástico resistente.
- Extracción de órganos y manipulación de cultivos en cabinas de flujo laminar.

## Cabinas de flujo laminar:

- Impiden la entrada de aire desde el exterior.
- Corriente laminar de aire filtrado de microorganismos.



## Tipos de cultivos.

### - Tisulares y organotípicos:

- Fragmentos de órganos o un órgano completo.
- Se mantiene la organización histológica (cél-cél y célula-matriz extracelular).
- Limitación debida al grosor: difusión de nutrientes y oxígeno.

### - Cultivos celulares: células aisladas que tienden a formar una monocapa.

- Cultivos primarios:

Disgregación enzimática, mecánica o química de un órgano.

Siembra de células en las placas de cultivo.

Las células suelen conservar la morfología que tenían en el órgano.

Crecimiento *in vitro* es lento y limitado, llegando un momento en el que las células dejan de dividirse y mueren (senescencia).

- Cultivos secundarios:

Cuando uno o varios tipos de células de un cultivo primario se re-siembran.

Pueden cultivarse durante mayores periodos de tiempo.

Diversidad celular restringida, dependiente de los medios de cultivo usados.

También se pueden obtener a partir de tejidos tumorales.

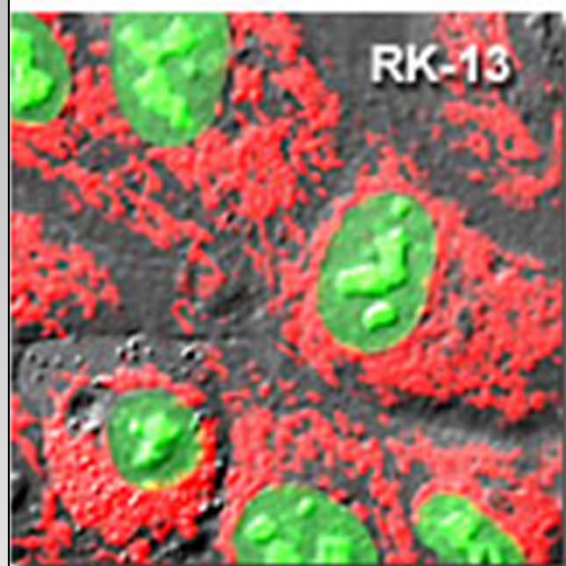
A partir de ellos se obtienen líneas celulares.

**TABLE 8-2 Some Commonly Used Cell Lines**

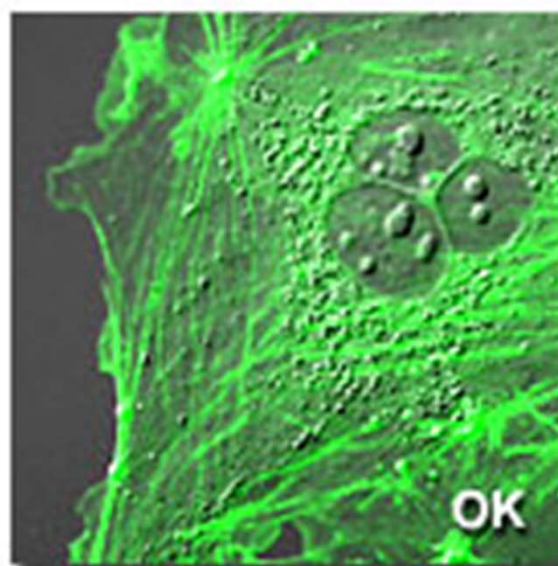
| CELL LINE* | CELL TYPE AND ORIGIN                                       |
|------------|------------------------------------------------------------|
| 3T3        | fibroblast (mouse)                                         |
| BHK21      | fibroblast (Syrian hamster)                                |
| MDCK       | epithelial cell (dog)                                      |
| HeLa       | epithelial cell (human)                                    |
| PtK1       | epithelial cell (rat kangaroo)                             |
| L6         | myoblast (rat)                                             |
| PC12       | chromaffin cell (rat)                                      |
| SP2        | plasma cell (mouse)                                        |
| COS        | kidney (monkey)                                            |
| 293        | kidney (human); transformed with adenovirus                |
| CHO        | ovary (chinese hamster)                                    |
| DT40       | lymphoma cell for efficient targeted recombination (chick) |
| R1         | embryonic stem cells (mouse)                               |
| E14.1      | embryonic stem cells (mouse)                               |
| H1, H9     | embryonic stem cells (human)                               |
| S2         | macrophage-like cells ( <i>Drosophila</i> )                |
| BY2        | undifferentiated meristematic cells (tobacco)              |

\*Many of these cell lines were derived from tumors. All of them are capable of indefinite replication in culture and express at least some of the special characteristics of their cell of origin. BHK21 cells, HeLa cells, and SP2 cells are capable of efficient growth in suspension; most of the other cell lines require a solid culture substratum in order to multiply.

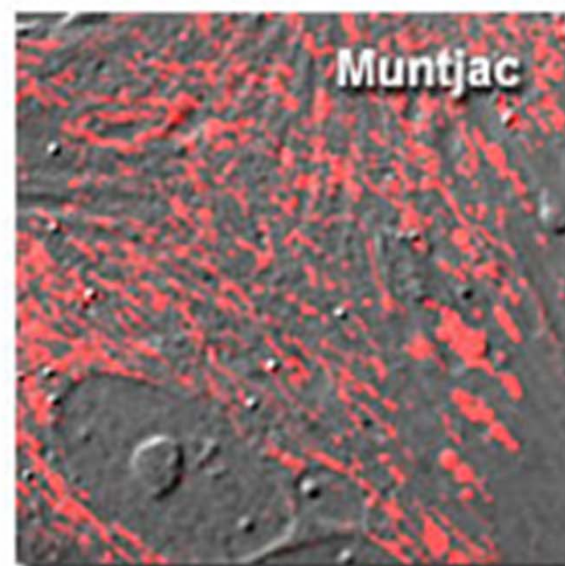
## Live-Cell Imaging with Fluorescent Proteins and DIC



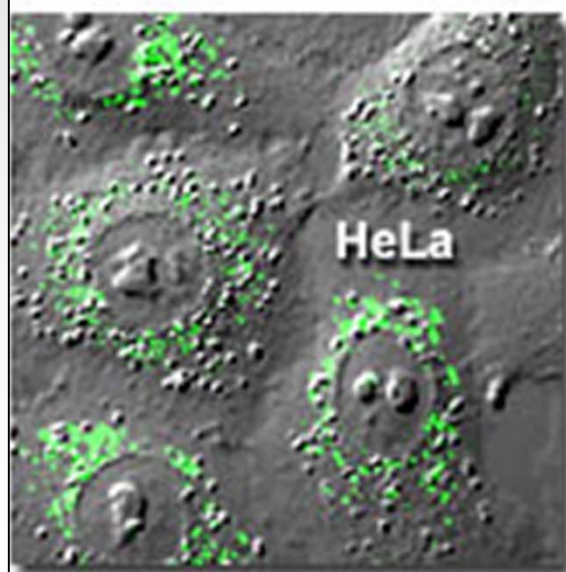
(a)



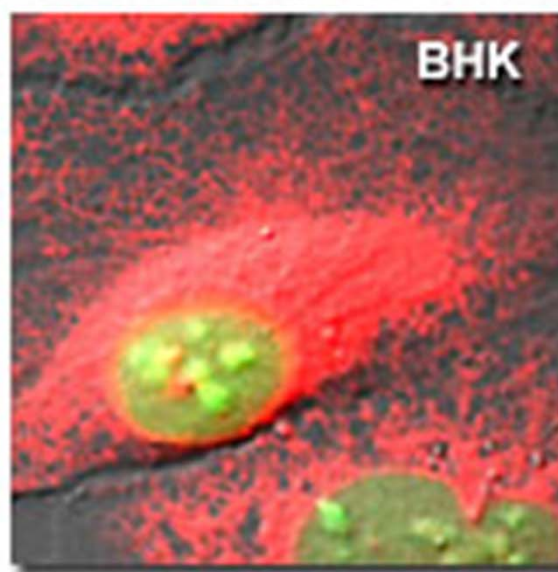
(b)



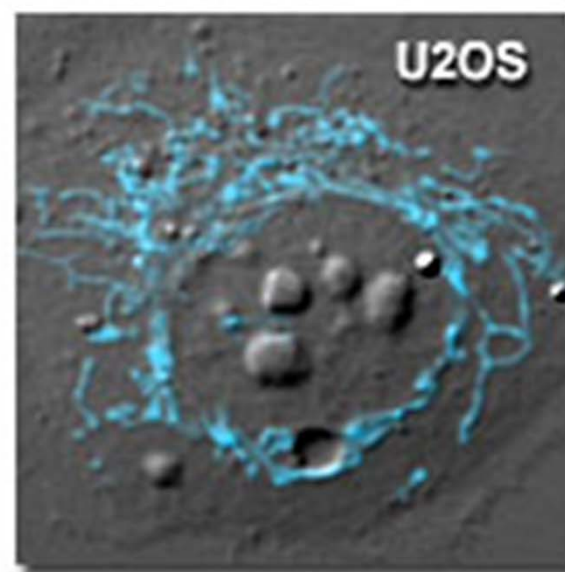
(c)



(d)



(e)



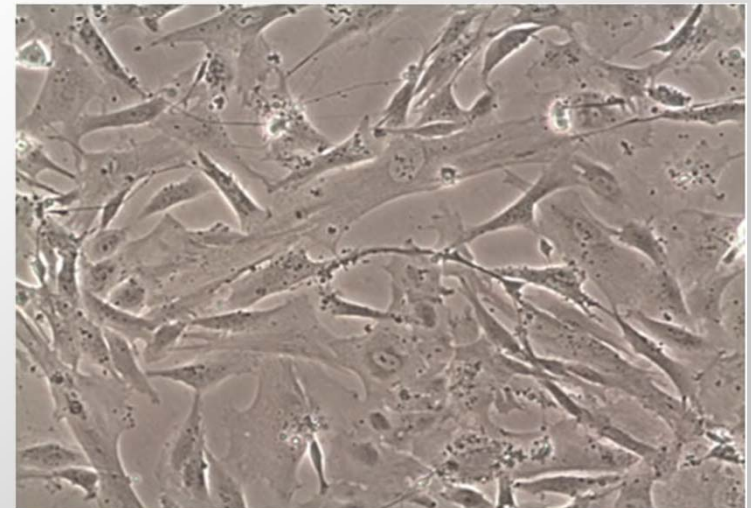
(f)

Figure 1

## En nuestro caso ...

### Objetivo:

Realizar un cultivo de una línea celular transformada de astrocitos de rata, para inmunodetectar los filamentos de vimentina en la práctica 4ª.

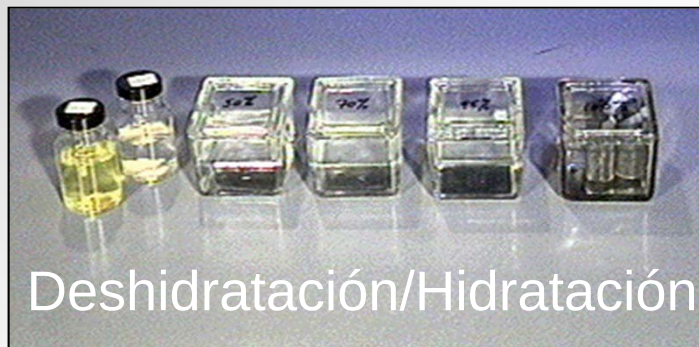


# **PROCESAMIENTO DE TEJIDOS**

**FUNDAMENTOS DE FIJACIÓN, INCLUSIÓN Y CORTADO**

**FUNDAMENTOS DE TINCIÓN**

# Procesamiento de tejidos.



- 1- Obtención.
- 2- Fijación.
- 3- Deshidratación.
- 4- Inclusión.
- 5- Seccionamiento.
- 6- Montaje en portaobjetos.
- 7- Hidratación.
- 8- Tinción.
- 9- Deshidratación.
- 10- Protección con bálsamos histológicos y cubreobjetos.

# FIJACIÓN.

## Objetivo:

Evita la degradación *post-mortem* del tejido, preservando la estructura y composición química de la muestra.

## Tipos de fijación:

### 1.- Física.

**Calor:** desecación.

**Frío:** congelación rápida. (Ej: N<sub>2</sub> líquido = -196°C).



**Crioprotectores:** evitan la formación de macro-cristales de hielo.

### 2.- Química.

1. **Entrecruzantes:** aldehídos como formaldehído, glutaraldehído, paraformaldehído.

Forman puentes hidroximetileno entre el fijador y las proteínas. Red 3D.

2. **Oxidantes:** dicromato potásico y tetraóxido de osmio. Microscopía electrónica.

3. **Precipitantes:** desnaturalizan proteínas modificando su estructura terciaria.

a. alcohólicos (metanol y etanol).

b. ácidos (ácido acético).

c. metálicos (cloruro de mercurio).

Ácido pícrico: se crean sales insolubles con las proteínas.

# INCLUSIÓN.

## **Objetivo:**

Sustitución del agua del tejido por una sustancia dura, facilitando así su seccionamiento.

## **Medios de inclusión:**

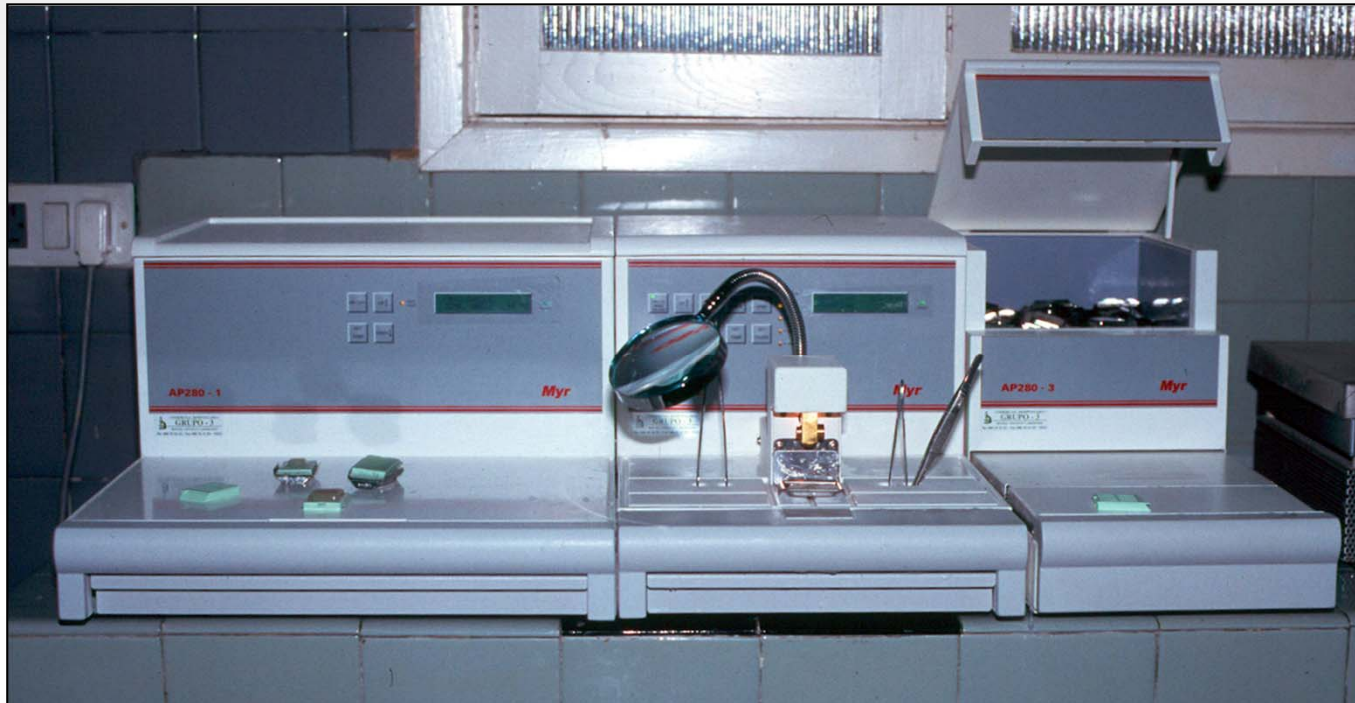
### **1.- Hidrofóbicos:**

- Requieren la deshidratación previa del tejido con etanol en concentraciones crecientes (50%, 70%, 96%, 100%) y xileno.
- Parafina, resinas.

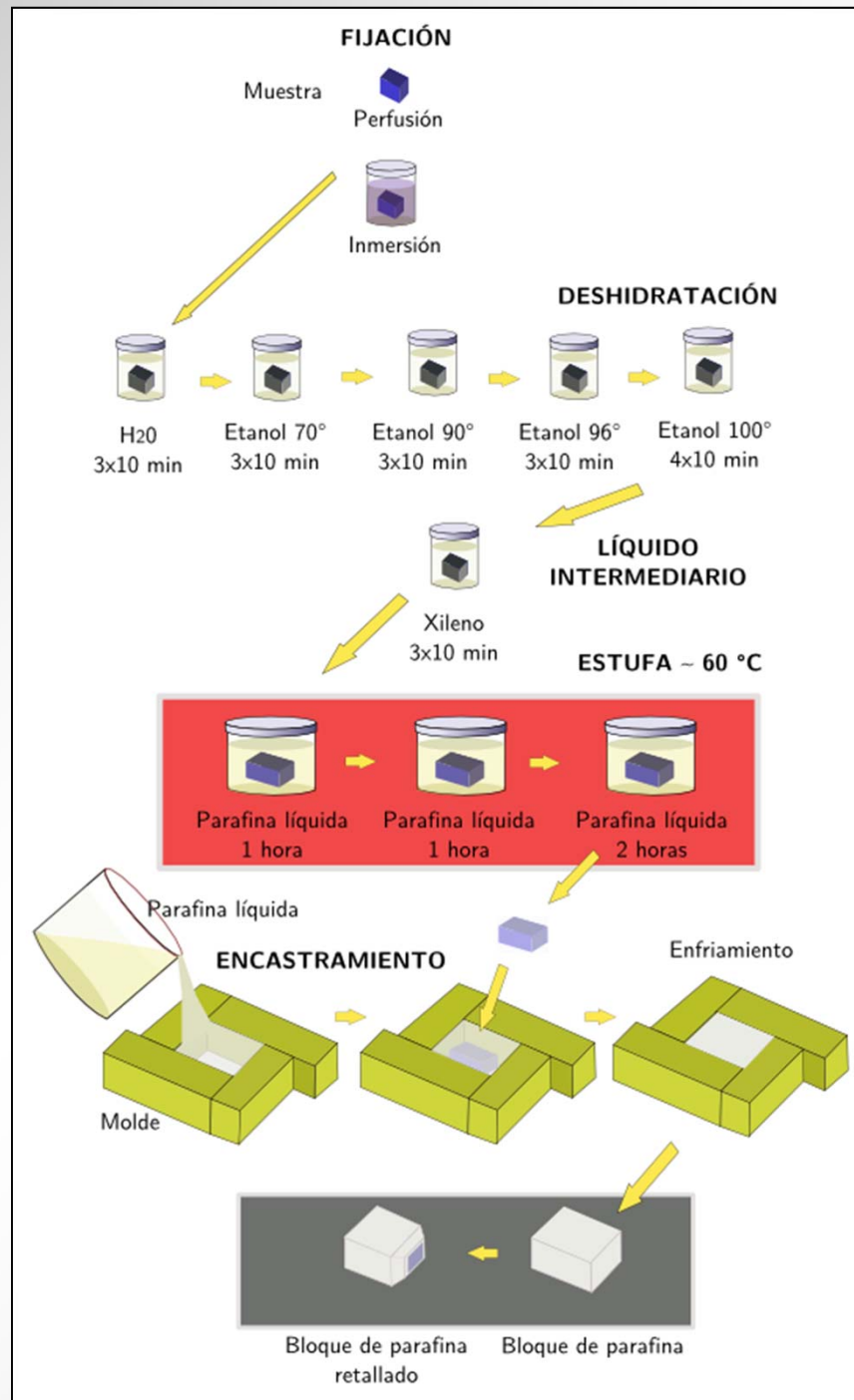
### **2.- Hidrofílicos:**

Gelatina, Agar, Polietilenglicol, Poliacrilamida, etc.

# INCLUSIÓN EN PARAFINA.



# INCLUSIÓN EN PARAFINA.



## SECCIONAMIENTO.

### Objetivo:

Obtener secciones suficientemente finas para ser atravesadas por la luz.

### Instrumentos empleados:

#### **Microscopía óptica:**

- Vibratomos (50-500  $\mu\text{m}$ ).
- Microtomos (1-30  $\mu\text{m}$ ): de rotación, de deslizamiento, etc.
- Criostatos (2-50  $\mu\text{m}$ ): material congelado.

#### **Microscopía electrónica:**

- Ultramicrotomos:  
Secciones semifinas (1-5  $\mu\text{m}$ ).  
Secciones ultrafinas (25-1000 nm).

## MONTAJE.

**Microscopía óptica:** portaobjetos de vidrio.

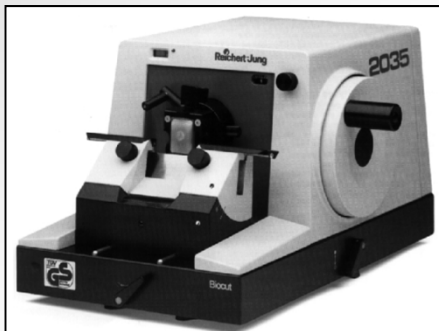
**Microscopía electrónica:** rejillas metálicas.

# SECCIONAMIENTO.

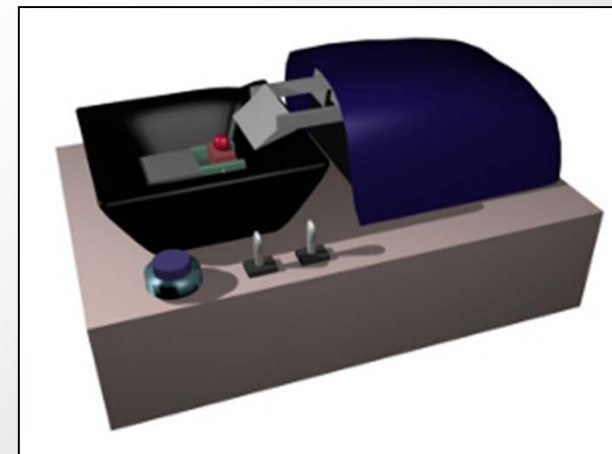
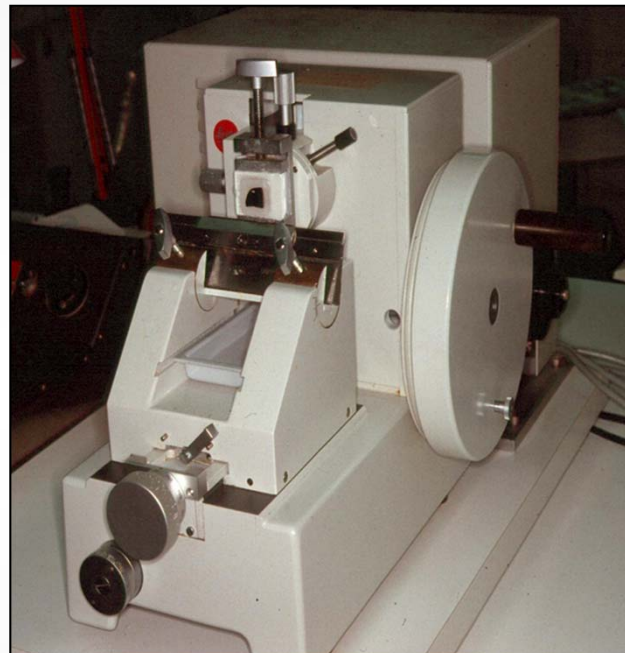
Microtomo de  
mano



Microtomo de  
deslizamiento



Microtomo de  
rotación



Vibratomo

# SECCIONAMIENTO.

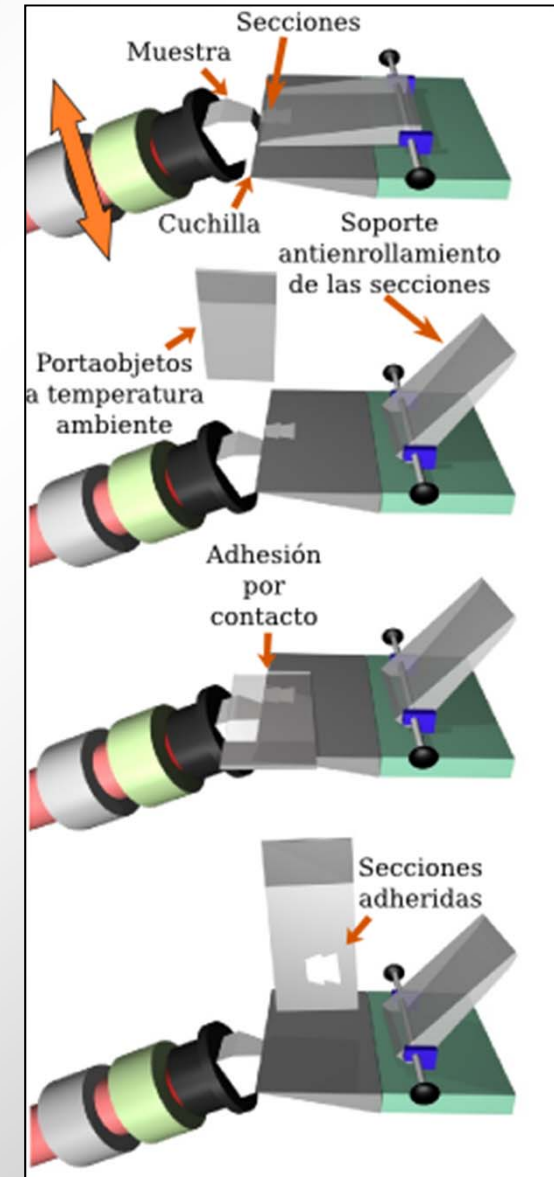


Obtención de cortes seriados

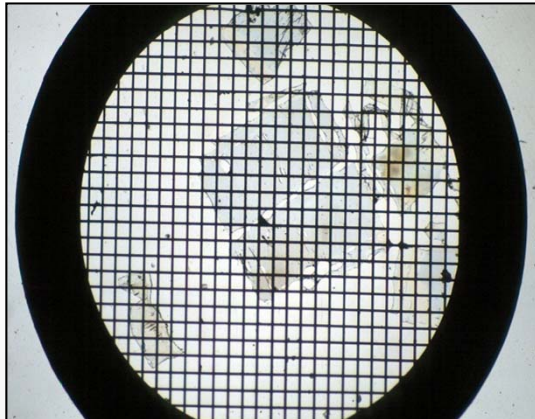
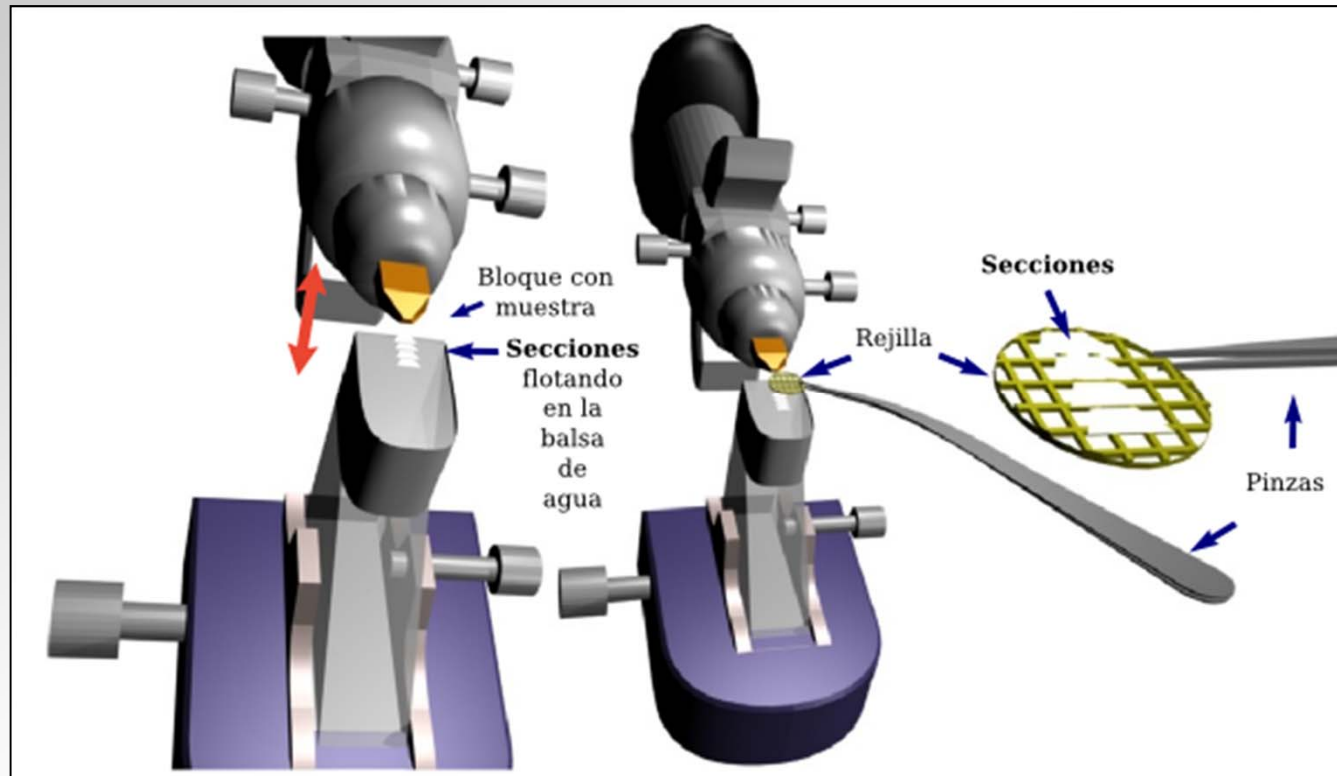


Recogida de las secciones tras el corte en el baño de flotación

# Criostato



# Ultratomo



# TINCIÓN.

## **Objetivo:**

Conferir contraste al tejido, para realizar el estudio histológico microscópico, ya que la densidad óptica de las moléculas biológicas es muy similar (poco contraste).

## **Tipos:**

Convencionales: para estudios morfológicos.

Específicas: para detectar moléculas determinadas.

## **Tinciones Convencionales:**

Se basan en afinidades químicas de los colorantes por las distintas moléculas ionizadas que integran las células.

Los colorantes son sales neutras, que al disolverse en agua, se disocian en:

- Aniones<sup>-</sup> ácidos → Los **col. Ácidos** se unen a grupos básicos (pte. citoplasma).
- Cationes<sup>+</sup> básicos → Los **col. Básicos** se unen a grupos ácidos (pte. ADN núcleo).

## **Tinciones Específicas:**

Se emplean en la detección de moléculas concretas.

Pueden ser enzimológicas, inmunohistoquímicas, etc.

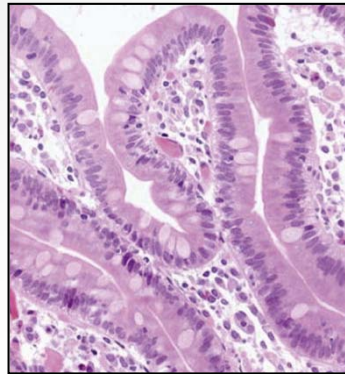
## En nuestro caso ...

### **Objetivo:**

Realizar dos tinciones convencionales (hematoxilina-eosina y tricrómica), empleando cortes histológicos de intestino de ratón.

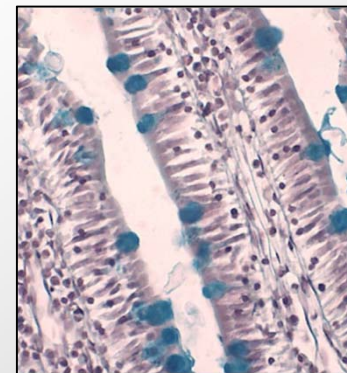
### **Tinción 1:**

hematoxilina-eosina.



### **Tinción 2 (tricrómica):**

azul alcian, hemalumbre y picrocarmín de índigo.



**Montaje preparaciones.**



# PREPARACIÓN DE PBS (Phosphate-buffered saline) 10x.

## Objetivo:

Preparar una solución tampón básica en cualquier laboratorio de Biología Celular

## Composición del PBS 1x:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 1,855 \text{ mM}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 8,397 \text{ mM}$

$\text{NaCl} = 0,15 \text{ M}$



## Preparar 500 ml de PBS 10x sabiendo que el peso molecular es el siguiente:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 137,99$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 141,96$

$\text{NaCl} = 58,44$

Pesar, añadir agua destilada, comprobar y ajustar el pH a 7,2-7,4, enrasar hasta el volumen final (500ml).

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{n \text{ (moles)}}{\text{volumen (L)}} \quad n = \frac{\text{masa (g)}}{\text{PM}}$$