



Facultad de Biología
Dpto. Biología Celular (Morfología Microscópica)

C/ José Antonio Novais nº 2.
Ciudad Universitaria 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 49 81. Fax: 91 394 49 81

QUIÓN DE PRÁCTICAS

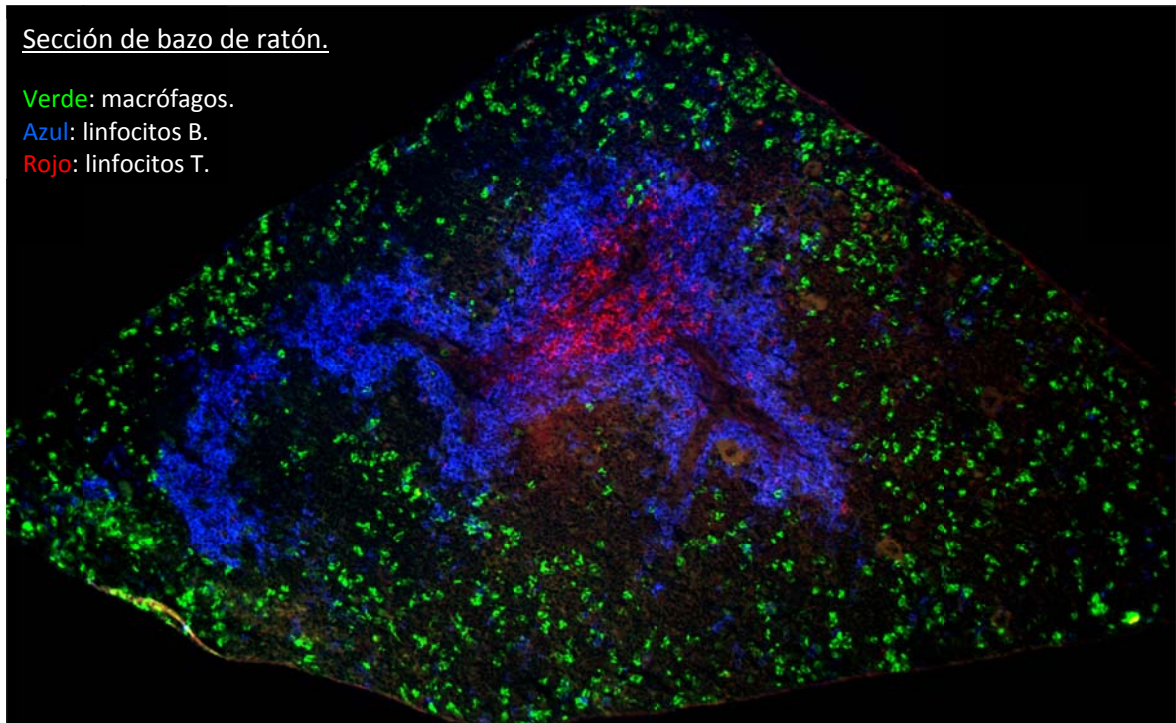
(Asignatura: BIOLOGÍA CELULAR e HISTOLOGÍA)

Sección de bazo de ratón.

Verde: macrófagos.

Azul: linfocitos B.

Rojo: linfocitos T.



PARTE DE BIOLOGÍA CELULAR

Laboratorios: A12.2, planta 12.

(5 sesiones de 3 horas)

GRADO EN BIOLOGÍA

NORMAS GENERALES DE LABORATORIO

- Se trabajará en equipos de 2-3 personas, según el número total de alumnos.
- Cada equipo 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 listos para el siguiente turno; es decir, con todo el material **LIMPIO** (lavado con agua y jabón y aclarado con agua destilada) y **SECO**. Si se ha ensuciado el papel de filtro sobre el que se trabajaba, deberá cambiarse.
- Las cubetas con los colorantes para realizar las tinciones histológicas deberán permanecer **ordenadas** en la zona correspondiente del laboratorio, junto con el resto de material necesario (cubreobjetos y DPX).
- Antes de utilizar las **pipetas automáticas**, se debe comprobar el **rango de volumen** de 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). Una vez terminadas de utilizar, las pipetas automáticas deberán colocarse siempre en la parte central de la mesa del laboratorio.
- Los residuos se depositarán en el punto limpio, cada uno en el contenedor adecuado.
- Tras utilizar los microscopios, se dejarán apagados (sin desenchufar), con el objetivo de menor aumento y con la funda puesta.
- Tan sólo se utilizarán guantes cuando el profesor lo recomiende.

MATERIAL EN CADA PUESTO DE TRABAJO

En cada puesto de trabajo se encontrarán los siguientes materiales:

- 1 Gradilla para tubos *Eppendorf*.
- 1 Gradilla tubos *Falcon*.
- 1 Caja transparente (se usará como cámara húmeda).
- 1 Frasco de 100 ml de tapa azul.
- 2 Tetinas para las pipetas *Pasteur*.
- 1 Placa *Petri* pequeña con una rejilla/malla metálica.
- 1 Cubeta *Coplin* de vidrio para lavar las preparaciones.
- Tubos *Falcon* graduados de 15 ml.
- 1 Vaso de cristal para residuos.
- 1 Caja de puntas azules (200-1000 μ l).
- 1 Caja de puntas amarillas (2-20 μ l y 20-200 μ l).
- Tubos *Eppendorf*.

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 a cultivar se realizarán en la cabina de flujo laminar.
- Se usarán guantes, que se frotarán con alcohol 70%, antes de empezar a trabajar en la cabina de flujo.
- Usar *Pipetboy* o pipetas automáticas para añadir cualquier reactivo.
- Mantener los recipientes abiertos el menor tiempo posible.
- Todo el material que se utilice, así como las soluciones a emplear, han de ser esterilizados previamente.
- Con las puntas desechables de las pipetas no se debe tocar ninguna superficie para evitar contaminaciones.
- Todas las botellas de medio y/o cualquier solución deben atemperarse en un baño y secarse cuidadosamente antes de usarlas.
- Ante cualquier duda limpiar con alcohol 70 % cualquier material 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 ultravioleta (UV).

GESTIÓN DE RESIDUOS

Para un mejor funcionamiento de los laboratorios existe **UN PUNTO LIMPIO**, donde 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:

- Restos de medios de cultivo: inactivarlos con lejía y posteriormente desechar al contenedor de residuos biológicos.
- Restos de PBS y tampón de lisis: desecharlos.
- Acetona: recuperarla en la misma botella.
- Vidrio y plásticos: se deberán desechar en el recipiente específico "MATERIAL CONTAMINADO" (tubos *Eppendorf*, puntas de pipeta, pipetas *Pasteur*, portaobjetos y cubreobjetos).
- 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**", inactivados con la solución de KMnO_4 3% / Na_2CO_3 2% y agua destilada (en la misma proporción que el volumen de DAB desechado).
- Basura general: los guantes y todo lo que no tenga un recipiente específico irá en este cubo.

UTILIZACIÓN DE PIPETAS AUTOMÁTICAS



Pipeta	Rango de medida	Tipo de puntas
Pequeña	0-10 μl	Blancas
Pequeña	10-20 μl	Amarillas
Intermedia	20-200 μl	Amarillas
Grande	200-1000 μl	Azules

Pipetas automáticas: pueden ser de volumen fijo o graduable. La parte superior del émbolo tiene tres posiciones. Se cargan apretando hasta la posición intermedia y soltando lentamente y se descargan presionando a fondo. 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.

PRÁCTICAS

Práctica 1.- Introducción a los cultivos celulares. Introducción a las técnicas de procesamiento y tinción de tejidos. Preparación de reactivos.

Técnica de Hematoxilina-Eosina.
Técnica de tinción tricrómica.
Cultivo de una línea celular.
Preparación de PBS 10x.

Práctica 2.- Suspensión celular de bazo: disgregación mecánica y separación de células adherentes.

Obtención de una suspensión celular de bazo.
Determinar la viabilidad celular mediante azul tripán.
Separación celular por adherencia, determinando el porcentaje de adhesión.
Preparación de CTCs con células de bazo para la práctica 3.

Práctica 3.- Inmunodetección directa en linfocitos B.

Inmunodetección directa de IgG en las células de las CTCs de la práctica 2.

Práctica 4.- Identificación de astrocitos por inmunodetección indirecta de vimentina (filamento intermedio).

Inmunodetección diferencial de filamentos intermedios (vimentina) y contratinción diferencial en los portaobjetos preparados en la práctica 1.

Práctica 5.- Microscopía óptica.

Manejo del microscopio óptico.
Visualización e interpretación de las preparaciones realizadas.

PRÁCTICA 1

Introducción a los cultivos celulares. Introducción a las técnicas de procesamiento y tinción de tejidos. Preparación de reactivos.

Esta práctica se dividirá en cuatro partes:

1. Tinción de Hematoxilina-Eosina sobre un corte de tejido de mamífero.
2. Tinción tricrómica: Azul Alcían-Hemalumbre-Picrocarmín de Índigo.
3. Descongelar una línea celular y sembrarla para ser usada en la práctica 4.
4. Preparar PBS 10x.

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS.



Para la realización de las siguientes tinciones convencionales, se emplearán cortes histológicos de intestino de ratón, previamente fijado e incluido en parafina, proporcionados por el profesor, que estarán ya desparafinados e hidratados.

1ª Parte: TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.



1. Teñir la preparación con **Hematoxilina de Carazzi** (se da ya preparada según las siguientes concentraciones en H₂O destilada: 0.1% hematoxilina/20% glicerina/ 5% alumbre potásico/0.02% yodato potásico) durante **10 minutos**.
2. Lavar bajo el flujo de agua corriente hasta “azulear” (unos 5 min).
3. Teñir la preparación con **Eosina** (Se da ya preparada según las siguientes concentraciones en H₂O destilada: 1.25% eosina) durante **2 minutos**.
4. Lavar con agua corriente varias veces hasta que el agua quede limpia.
5. Diferenciar y deshidratar:
 - 10 s – 20 s Etanol 96 %.
 - 1 min – Etanol 100% (dos veces).
 - 1 min – Xileno (dos veces).


6. Montar con DPX.



7. Una vez montadas las preparaciones, dejar secar para observarlas al microscopio el último día.

**2ª Parte: TINCIÓN TRICRÓMICA: AZUL ALCIÁN- HEMALUMBRE-
PICROCARMÍN DE ÍNDIGO.**



1. Teñir la preparación durante **10 min.** con **Azul Alcían** (se da ya preparado según las siguientes concentraciones en H₂O destilada: 1% azul alcían/3% ácido acético).
2. Lavar bajo el flujo de agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
3. Teñir durante **8 min.** la preparación con **Hemalumbre** (se da ya preparado según las siguientes concentraciones en H₂O destilada: 0,2% hemateína/5% alumbre potásico/2% ácido acético).
4. Lavar en agua corriente (unos 5 min).
5. Teñir **1 min.** la preparación con **Picrocarmín de Índigo** (se da ya preparado según las siguiente concentración: 3.5 g de carmín de índigo y 1000 ml de ácido pícrico saturado).
6. Lavar en agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
7. Deshidratar:
 - a. Etanol 100 % - **2 min** (dos veces).
 - b. Xileno - **1 min** (tres veces).
8. Montar con DPX. 
9. Una vez montadas las preparaciones, dejar secar para observarlas al microscopio el último día.

3ª Parte: CULTIVO DE UNA LÍNEA CELULAR.



Se descongelará una línea celular de astrocitos de rata transformados, proporcionada por el profesor. Todo se realizará en la cabina de flujo laminar.

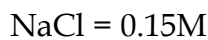
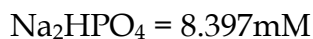
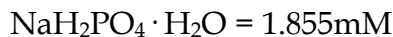
1. Descongelar rápidamente el vial con las células y pasarlas a un *Falcon* de 15ml.
2. Lavar las células con RPMI y centrifugar (5 min, 1500 rpm).
3. Resuspender en un volumen suficiente de medio de cultivo para que cada grupo pueda añadir unos 200µl/placa *Petri*.
4. Se añaden 15 ml de medio de cultivo completo (RPMI con L-glutamina + 1% penicilina-estreptomicina + 10% suero fetal bovino (FBS)), a una placa *Petri* con un portaobjetos estéril en el interior. El medio de cultivo tiene que estar previamente atemperado.
5. Una vez preparada la placa de cultivo, se añaden 200 µl de la suspensión celular con astrocitos en el interior de la placa *Petri*. Agitamos suavemente para que las células se repartan.
6. Se dejará crecer el cultivo durante unas 72h y se usarán las células crecidas sobre el portaobjetos para detectar la expresión de vimentina en la práctica 4.
7. Se introducen en el incubador a 37°C, 5% CO₂.

4ª Parte: PREPARACIÓN DE PBS 10x.

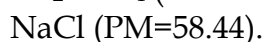
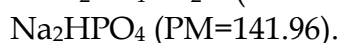


Se preparará una de las soluciones básicas en cualquier laboratorio de Biología Celular.

1. Composición del PBS 1x:



2. Se calcularán las cantidades necesarias de cada uno de los compuestos para preparar 500 ml de PBS 10x, sabiendo que:



3. Cuando lo sepamos, cogeremos 400ml de H₂O destilada, añadiremos los solutos, ajustaremos el pH a 7.2-7.4 y enrasaremos al volumen final (500 ml).

PRÁCTICA 2



Suspensión celular de bazo: disgregación mecánica y separación celular de células adherentes.

1. Dividir los bazos en tres partes y repartir un fragmento por grupo.
2. Cada grupo humedecerá la malla con una gota de RPMI, situada sobre la placa *Petri* de cristal, y disgregará el tejido con un émbolo de jeringa.
3. Cuando el bazo quede reducido a una masa de fibras de color blanco, añadiremos RPMI al 2% de FBS (máximo 2 ml) con la pipeta *Pasteur* para recoger las células.
4. Una vez disgregado el órgano, retirar la malla con los restos. Homogeneizar la suspensión con la jeringuilla (sin aguja), subiendo y bajando el émbolo varias veces (CON CUIDADO) hasta asegurarnos de que se han deshecho los grumos.
5. **Desde este punto se trabajará poniendo la suspensión en hielo.** Recoger la suspensión celular con una pipeta *Pasteur* y filtrarla a través de otra pipeta *Pasteur* larga que contiene algodón (**previamente humedecido con 2 ml de RPMI al 2% FBS**), recogiéndola en un *Falcon* de 15 ml graduado.
6. Una vez filtrada, añadir 1 ml más de RPMI al 2% FBS al algodón para recuperar el mayor número de células posible.
7. Centrifugar durante 5 minutos a 1800 rpm.
8. Resuspender en 1 ml de **tampón de lisis** (160mM NH_4Cl + 5.7mM K_2HPO_4 + 0.1mM EDTA, diluido en H_2O y con pH 7.3), para eliminar los eritrocitos existentes. **Mantener el tubo en hielo 10 minutos.**
9. Añadir 4 ml de RPMI 2% FBS para detener la lisis de las células y centrifugar durante 5 minutos a 1800 rpm.
10. Antes de resuspender el pellet, cada grupo deberá **preguntar al profesor** cuántos ml de RPMI al 2% FBS son necesarios para su pellet.
11. Contar el número de células/ml, determinando también la **viabilidad celular**. **Para ello, se ponen** 100 μl de suspensión celular más 100 μl de azul tripán en un *Eppendorf* y se cuentan las células en el **hemocitómetro o cámara de Neubauer**, calculando la concentración celular y el **índice de viabilidad**.

Hemocitómetro, conteo de células e índice de viabilidad celular.

- Colocar un cubreobjetos en la parte central de un hemocitómetro limpio.
- Tomar 10 μl de una muestra homogeneizada de la suspensión celular con la pipeta automática y llenar la cámara entre el hemocitómetro y el cubreobjetos con la suspensión celular sin que rebose. Para ello coger la pipeta automática con una mano, apoyar la punta en el hemocitómetro cerca del borde del cubreobjetos y descargar la pipeta.
- Para determinar la concentración celular en una suspensión celular se han de contar las células presentes en el volumen contenido entre el cubreobjetos y uno de los cuadros de tipo "A" (1 "A"=16 "B") de la cuadrícula del hemocitómetro (ver figura). Éste equivale a 10^{-4} ml (0.1 mm profundidad \times 1 mm² área = 0.1 mm³ = 0.1 μl = 10^{-4} ml).
- Para mejorar la estimación, es preferible contar las células en varios cuadrados del mismo tipo (B), generalmente en las cuatro diagonales "A" (ver figura).
- De esta forma, al contar las células que hay en los 16 cuadrados "B", la concentración de células en la suspensión celular se obtendrá así:

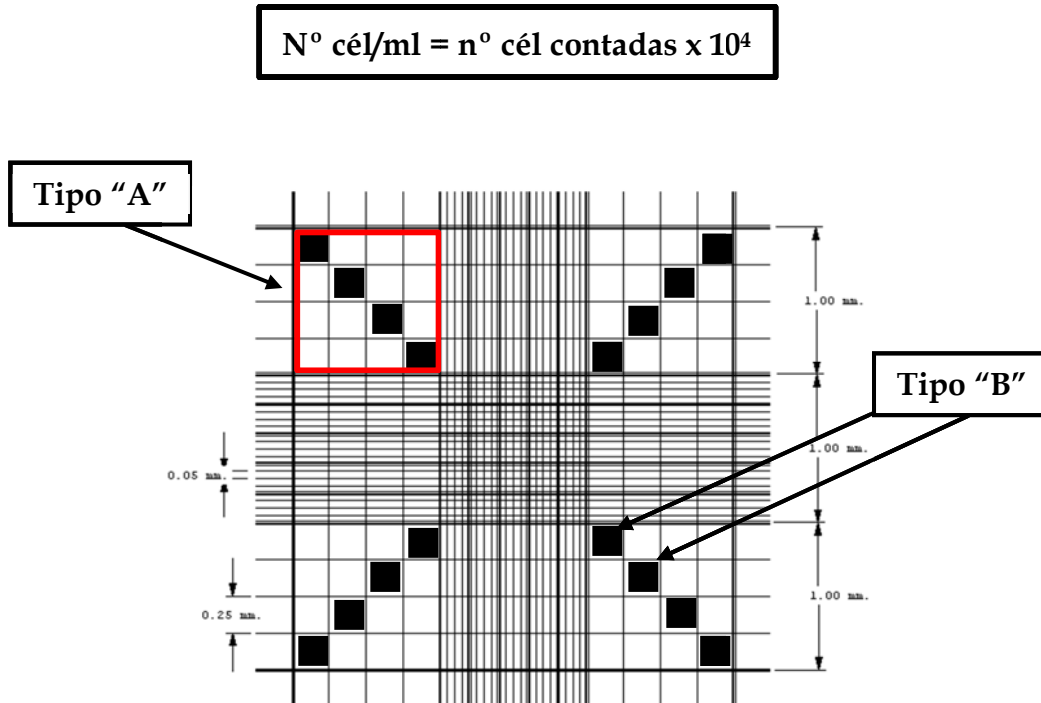


Figura. Esquema de una cámara de Neubauer donde se indican los cuadrados de tipo "A" (rojo) y de tipo "B" (negro), que se suelen usar para calcular el número de células/ml. de una suspensión.

- Un rango celular aceptable para contar está entre 20 y 50 células aproximadamente, en un cuadrado tipo "B" del hemocitómetro. Si el número es superior habrá que diluir la muestra.
- También se ha de tener en cuenta si se ha diluido la suspensión celular antes de realizar el recuento celular. **(En nuestro caso al diluir 1/2 con azul tripán, habría que multiplicar, además, el número de células por 2).**
- Para facilitar la visibilidad de las células y de la retícula del hemocitómetro, es conveniente realizar la observación **con el condensador subido y el diafragma cerrado.**

Determinación de la Viabilidad Celular.

El número de células viables de una suspensión celular se puede determinar diferenciando con azul tripán las células muertas, que se tiñen de azul, de las células vivas que, sin embargo, excluyen dicho colorante y no se tiñen.

Para ello, mezclamos en un *Eppendorf* 100 µl de la suspensión celular problema y 100 µl de azul tripán y seguidamente contamos en el hemocitómetro las células vivas (brillantes) y las células muertas (azules).

Así se puede determinar la viabilidad celular y el número de células de la suspensión celular:

$$\% \text{ _ Cél. _ Viables} = \frac{N^{\circ} \text{ cél. _ Viables}}{(N^{\circ} \text{ cél. _ Viables} + N^{\circ} \text{ cél. _ Muertas})} \times 100$$

Ejemplo: en un cuadrado "B" del hemocitómetro se han contado 8 células muertas (azules) y 45 células vivas (brillantes), por tanto:

$$\% \text{ Células Viables} = [45 / (45 + 8)] \times 100 = 80 \% \text{ de viabilidad celular}$$

Densidad celular = 45 (cél. vivas en un "B") x 16 x 2 (coeficiente de dilución) x 10⁴ = 14,40 x 10⁶ cél. vivas/ml.

Continuamos con los ensayos de la práctica 2:

12. ENSAYO DE ADHESIÓN.

Preparamos 3 ml de una suspensión celular con una concentración de 2×10^6 cél/ml en RPMI 2% FBS. Añadirla a una placa *Petri* de plástico e incubar toda la noche a 4°C , a temperatura ambiente o a 37°C (**según las indicaciones del profesor**), para permitir la adherencia de las células.

13. CITOCENTRIFUGACIONES (CTCs).

Preparamos un tubo con 1 ml de la suspensión celular a una concentración de 0.5×10^6 cél/ml en RPMI/2% FBS. Guardar en hielo.

14. Hacer 2 preparaciones (Control y Muestra) mediante CTC (para la práctica 3) de la suspensión celular del tubo que contiene 0.5×10^6 /ml:

- Poner 100 μl de la suspensión celular.
- Centrifugar 5 minutos a 300 rpm.
- Dejar secar a temperatura ambiente unos segundos.
- Fijar con acetona fría 10 minutos.
- Rodear las células con *Immunopen*®.
- Dejar secar hasta el día siguiente.

PRÁCTICA 3



Inmunodetección directa en linfocitos B de la suspensión celular obtenida en la práctica 2.

Se usarán las dos CTC preparadas en la práctica 2. Una de ellas se usará para realizar la inmunodetección directa (muestra) y la otra será un control de anticuerpo.

Nota importante: todas las incubaciones se realizarán en cámara húmeda. Antes de cada incubación, secar bien el portaobjetos en la zona opuesta a donde se encuentran las células. **Las células deberán permanecer siempre húmedas.**

1. Rehidratar las preparaciones con PBS, introduciéndolas en la cubeta de tinción situada en el centro de la mesa del laboratorio.
2. Inhibir la peroxidasa endógena: poner **ambos** portaobjetos en una cubeta de Coplin durante 15 minutos con la siguiente disolución de PBS al 2% de H₂O₂:
 - 49 ml PBS
 - 1 ml H₂O₂
3. Lavar con PBS durante 3 minutos en la cubeta de tinción.

A partir de este punto sólo se trabaja con un portaobjetos (muestra).
El **otro portaobjetos**, preparación control (al que no vamos a añadir el anticuerpo), se deja en la cubeta con PBS.

4. Incubar con el anticuerpo primario (anti-IgG de ratón desarrollado en cabra y conjugado con HRP) diluido 1/250 en PBS, con suero de cabra al 1%.
Añadir 100 µl de la dilución del anticuerpo **dentro** de la zona del portaobjetos delimitada con el *Immunopen*®. El suero de cabra al 1% se añade para evitar uniones inespecíficas.
5. Dejar incubando 45 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda.
6. Descartar la gota de anticuerpo de la preparación en el vaso de residuos.
7. Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS.
8. Sistema de revelado: la actividad peroxidasa se revela utilizando diaminobencidina (DAB) como sustrato. Para ello, el profesor preparará la solución de revelado, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

A partir de este punto se emplean los dos portaobjetos, incluido el que será utilizado como “control de anticuerpo”.

9. Añadir 100 µl de la solución de revelado **dentro** de la zona del portaobjetos delimitada con el *Immunopen*©

NOTA: Debido a la toxicidad de la DAB, serán los profesores los que la manipulen en todo momento.

10. Dejarlo reaccionar 15-20 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

11. Inactivar la DAB con la solución de KMnO_4 3%/ Na_2CO_3 2% y lavar la preparación con agua en la cubeta de *Coplin* (2 lavados de 2 minutos cada uno).

12. Deshidratar con un gradiente de etanol (introducir sucesivamente en etanol 96% y 100%, durante 30 segundos cada uno), aclarar en xileno 1 minuto (2 veces), cubrir con DPX y montar con un cubreobjetos.

CONTINUACIÓN DEL ENSAYO DE ADHESIÓN (Práctica 2).



- Con la suspensión que hemos incubado: agitamos suavemente el sobrenadante (células no adherentes depositadas en el fondo de la placa), lo resuspendemos varias veces con pipeta automática y lo pasamos a un tubo de ensayo graduado.
- Tomamos nota del volumen recuperado.
- Empleando el hemocitómetro, contamos el número de células recuperadas, usando azul tripán, y determinamos el índice de células adherentes y no adherentes.

$$\% \text{ _Cél. _NO _adherentes} = \frac{N^{\circ} \text{cél. _Recuperadas}}{N^{\circ} \text{cél. _Iniciales}} \times 100$$

$$\% \text{ Cél. adherentes} = 100 - \% \text{ Cél. NO adherentes.}$$

Con el porcentaje de células adherentes el profesor hará una tabla para observar las diferencias en la adhesión en función de si la incubación se realiza a 37°C, a temperatura ambiente o a 4°C. Los resultados de todos los grupos se analizarán estadísticamente en las prácticas de la asignatura de "Estadística Aplicada a la Biología".

PRÁCTICA 4



Identificación de astrocitos por inmunodetección indirecta de vimentina (un tipo de filamento intermedio).

1. Sacar el portaobjetos del medio de cultivo con unas pinzas, escurrir en un papel de filtro.
2. Fijación de las células: fijar con una solución de formaldehído al 4% en tampón PBS 0.1M, durante 5 minutos. (Usar guantes)
3. Lavar con PBS, 2 cambios de 2 minutos cada uno.
4. Inhibir la peroxidasa endógena: poner en cubeta de tinción durante 10 minutos con la disolución: 49 ml de PBS + 1 ml. de H₂O₂.
5. Lavar con PBS, 2 cambios de 2 minutos cada uno.
6. Escurrir bien el porta y secar con papel absorbente, respetando una zona circular de 1 a 2 cm de diámetro, que es en la que se realizará la inmunodetección. Hacer un círculo con el *Immunopen*© alrededor de la zona elegida.
7. Incubar con el anticuerpo primario (monoclonal, anti-vimentina de rata desarrollado en ratón) diluido 1/500 en PGT (PBS con 0.3% de gelatina y 0.3% de Tritón X100; la gelatina bloquea posibles uniones inespecíficas y el detergente tritón permeabiliza la membrana plasmática, facilitando la entrada del anticuerpo). Poner 100 µl de la dilución del anticuerpo **dentro** de la zona del portaobjetos delimitada con el *Immunopen*©.
8. Incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
9. Escurrir el anticuerpo primario en el vaso de residuos y lavar dos veces, durante 3 minutos cada vez, en PBS.
10. Incubar con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón desarrollado en cabra y conjugado con HRP) en la dilución 1/250 en PGT. Añadir 100 µl de la dilución del anticuerpo **dentro** de la zona del portaobjetos delimitada con el *Immunopen*©.
11. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
12. Escurrir y lavar con PBS, 2 cambios de 3 minutos cada uno.
13. Sistema de revelado: la actividad peroxidasa se revela utilizando diaminobencidina (DAB) como sustrato. Para ello, el profesor preparará la solución de revelado, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

14. Añadir 100 µl de la solución de revelado **dentro** de la zona del portaobjetos delimitada con el *Immunopen*©

NOTA: Debido a la toxicidad de la DAB, serán los profesores los que la manipulen en todo momento.

15. Dejarlo reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

16. Inactivar la DAB con la solución de KMnO_4 3%/ Na_2CO_3 2% y lavar la preparación con agua en la cubeta de *Coplin* (2 lavados de 2 minutos cada uno).

17. Para teñir los núcleos de los astrocitos, contrastaremos las preparaciones con **Azul de Toluidina** durante 2 minutos y lavar con agua, hasta eliminar el exceso.

18. Deshidratar:

- 30 s – Etanol 96 %
- 30 s – Etanol 100% (2 veces).
- 1 min. – Xileno (2 veces).

19. Montar con DPX.

20. Una vez montadas las preparaciones, dejar secar para observarlas al microscopio el último día.

Nota importante: Todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda. Antes de cada incubación secar bien el portaobjetos alrededor de la zona donde se encuentran las células pero no éstas. **LAS CÉLULAS DEBEN PERMANECER SIEMPRE HÚMEDAS.**

PRÁCTICA 5

Manejo del microscopio óptico. Observación e interpretación de las preparaciones realizadas durante las prácticas.

- En este último día se aprenderá a manejar el microscopio óptico de campo claro para poder visualizar todas aquellas preparaciones que se han realizado durante las prácticas anteriores.
- Concretamente:
 - a. Análisis de las preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina y la tinción tricrómica (Azul Alcían+Hemalumbre+Picrocarmin de Índigo).
 - b. Análisis de las CTCs de la práctica 3, comparando las preparaciones “muestra” y “control” para explicar las diferencias.
 - c. Análisis de la preparación de astrocitos, interpretando la localización celular del marcaje, así como las fases de la mitosis en que se encuentren las células en división.
- Imagen esquemática de un microscopio óptico de campo claro.



Partes de un microscopio:

1. Binoculares.
2. Revólver.
3. Objetivos.
4. Macrométrico.
5. Micrométrico.
6. Platina.
7. Fuente de luz.
8. Condensador y diafragma.
9. Desplazamiento platina.