

## ANÁLISIS DE DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

### 6 grupos de estudiantes

#### 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Esta práctica está diseñada para introducir a los estudiantes en el estudio de la estructura microscópica de las células (histología). Al finalizar esta práctica, los estudiantes podrán identificar varias líneas celulares principales examinando su morfología. Esto permite a los estudiantes conectar los conceptos de estructura celular con su función.

#### 2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
Portaobjetos de múltiples campos de reacción circulares listos para teñir (4 tipos de celdillas en cada uno)	Tª ambiente
Agente de fijación celular	Tª ambiente
Colorante eosina	Tª ambiente
Colorante azul de metileno	Tª ambiente
Medio de montaje	Tª ambiente
Cubreobjetos	Tª ambiente
Pipetas de Transferencia	Tª ambiente

**NOTA:** Almacenar todo el experimento a temperatura ambiente.

**NOTA:** Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No deben ser utilizados con fines diagnósticos o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

#### 2.1 Material requerido y no suministrado

- Microscopio.
- Pinzas.
- Agua destilada.
- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.

**NOTA:** Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### **MORFOLOGÍA CELULAR**

La **morfología celular** se refiere a la forma, apariencia y estructura de una célula. Estas características se visualizan mediante contraste de fase, microscopía confocal o electrónica. Para esta práctica se puede utilizar un microscopio óptico sencillo para realizar la observación de los diferentes tipos de células.

La morfología de una célula en cultivo está estrechamente relacionada con las funciones de las células dentro del tejido del que se derivan. Los tipos principales de células que se cultivan comúnmente incluyen **fibroblastos**, **células epiteliales** y **linfoblastos**.

#### **ADHESIÓN CELULAR**

La **adhesión celular** juega un papel crítico en el desarrollo, la cicatrización de heridas y la invasión tumoral, ya que la unión de células a la matriz extracelular y entre sí es crucial para el mantenimiento de la estructura e integridad de los tejidos. Los complejos multiprotéicos llamados **hemidesmosomas** son responsables de la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal subyacente, una capa de proteínas fibrosas que separa las células epiteliales del tejido conectivo subyacente. Su importancia se ha hecho evidente en las condiciones clínicas en las que la ausencia o defectos de las proteínas hemidesmosómicas dan como resultado enfermedades devastadoras de la piel.

Las conexiones laterales entre células adyacentes son estrechas y se caracterizan por la presencia de desmosomas y uniones estrechas. Estas uniones laterales forman una barrera impermeable que evita que las bacterias invadan el cuerpo. Las **uniones gap**, formadas por conexinas, permiten que las células se comuniquen entre sí a través del transporte de moléculas entre células.

#### **CÉLULAS MAMÍFERAS**

Las **células de mamífero** son células que se derivan o se aíslan del tejido de un mamífero. En este experimento, los estudiantes se presentan a cuatro tipos de células de mamíferos: fibroblastos, células epiteliales, linfocitos y macrófagos. Los linfocitos se encuentran dentro de la sangre. Las células epidérmicas, los fibroblastos y los macrófagos se encuentran dentro de los tejidos.

#### **FIBROBLASTOS**

Los **fibroblastos** están presentes en casi todos los tipos de tejidos (**Figura 1**). Los fibroblastos se originan a partir del mesodermo embrionario, como lo demuestra la presencia de la vimentina de la proteína del filamento intermedio. Esta proteína, junto con actina y tubulina, forma el soporte estructural de la célula. In vivo, los fibroblastos existen como células fusiformes únicas (anchas en el centro y ahusadas en los extremos) incrustadas en el tejido conectivo.

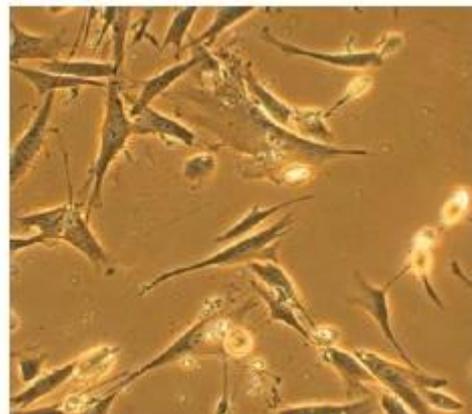


Figura 1: Fibroblasto

Los fibroblastos secretan proteínas que son importantes para la formación de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, elastasa, fibronectina y laminina. Los fibroblastos también juegan un papel importante en procesos fisiológicos normales tales como cicatrización de heridas segregando proteínas de matriz, factores de crecimiento y citoquinas. Los daños en los tejidos estimulan a los fibroblastos a diferenciarse en miofibroblastos, que se contraen para cerrar la herida.

Los fibroblastos muestran **inhibición de contacto**, un mecanismo de control del crecimiento diseñado para mantener fibroblastos que crecen en monocapas cuando están en contacto con células vecinas. Los fibroblastos también desempeñan un papel importante en muchos estados patológicos. La sobreproducción del tejido conectivo puede cambiar la morfología normal de un tejido, dando por resultado una condición llamada **fibrosis**. Los fibroblastos transformados también pueden dar lugar a un tipo de cáncer llamado **sarcoma**, que comprende tumores de células de origen mesenquimal (hueso, cartílago, grasa).

Los **Fibroblastos de Prepuccio Humanos (HS27)**, una línea celular muy estudiada, representan fibroblastos en este experimento. En el cultivo celular, estas células exhiben morfologías diferentes dependiendo de las condiciones de cultivo, genotipo y fase del ciclo celular. La mayoría de las veces, los fibroblastos mantienen su característica morfología fusiforme. Sin embargo, en la fase G2/M del ciclo celular, los fibroblastos pueden adoptar una forma redondeada en preparación para la división celular (mitosis y citocinesis).

### CÉLULAS EPITELIALES

Las **células epiteliales** pueden derivar de las tres capas germinales, aunque el epitelio verdadero se considera ectodérmico (**Figura 2**). Estas células se encuentran como una de tres formas posibles presentes en el cuerpo - escamosa (planas, las células son como láminas), cuboidal (la altura y la anchura son iguales) y columnar (las células son más altas que anchas). Las células epiteliales se convierten en láminas o tubos que separan el organismo de su medio ambiente, permitiendo la supervivencia de los organismos multicelulares. Estos tejidos se encuentran en todo el cuerpo, incluyendo la epidermis, sistema digestivo, sistema reproductivo y sistema endocrino.

**TEJIDO EPITELIAL**

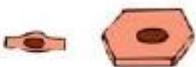
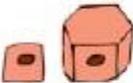
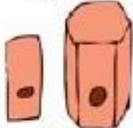
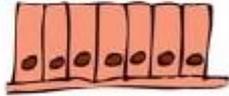
	Escamosa	Cuboidal	Columnar
Forma			
Simple			
Estratificado			

Figura 2: Células epiteliales

Los tejidos epiteliales se clasifican como **simples** (estómago, intestino, riñón), **estratificados** (epidermis, esófago, lengua) o **pseudoestratificados** (tráquea). Los epitelios simples y pseudoestratificados consisten en una sola capa de células que descansan sobre una membrana basal. En contraste, los epitelios **estratificados** consisten en dos o más capas, con sólo la capa divisoria de células unidas a la membrana basal. La comunicación entre las células epiteliales permite que los tejidos respondan de manera coordinada al crecimiento, la diferenciación y la cicatrización de heridas. En el estado transformado, los **queratinocitos** y otras células epiteliales dan lugar a **carcinomas**.

En el cultivo, las células epiteliales se adhieren firmemente al sustrato, dando como resultado una morfología celular aplastada. Las células formarán una monocapa contigua debido a la inhibición de contacto, el proceso por el cual las monocapas de células dejan de dividirse y migrar una vez que entran en contacto entre sí. La proteína de filamento intermedio queratina también se usa como un marcador celular para células epiteliales en cultivo celular.

En esta práctica, las células epiteliales están representadas por queratinocitos humanos que han sido inmortalizados usando oncogenes (no infecciosos) de **virus del papiloma humano (HPV)**. Aunque estas células están inmortalizadas, no se transforman, por lo que conservan todas las características de los queratinocitos humanos primarios.

## LINFOCITOS

Ambos glóbulos, rojos y blancos, se originan de una **célula totipotente** que se encuentra en la médula ósea llamada **célula madre hematopoyética**. El programa de diferenciación de estas células madre parece depender tanto de factores intrínsecos como externos. Los **glóbulos rojos** son responsables de suministrar oxígeno al cuerpo a través del sistema circulatorio. Los **glóbulos blancos**, o **leucocitos**, son responsables de la respuesta inmune en los mamíferos.

Los leucocitos se diferencian adicionalmente en **linfocitos**, **granulocitos** y **monocitos**. Los **linfocitos** dan lugar a **células T** y **B**, que son responsables de la inmunidad celular y humoral, respectivamente (**Figura 3**). Los **linfocitos T** se diferencian adicionalmente en **linfocitos T auxiliares (helper)**, **T supresores** y **citotóxicos**. Las células T helper estimulan la producción de anticuerpos y su liberación en las células B.

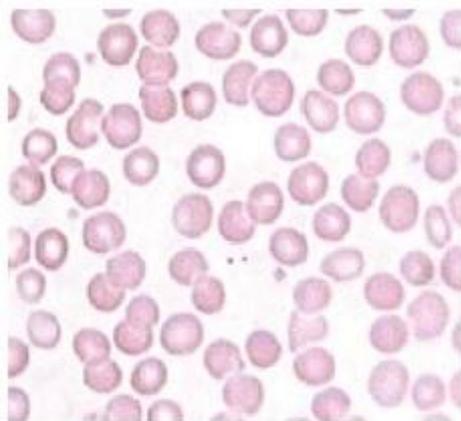


Figura 3: Limfocitos

Las células T y B no estimuladas tienen una apariencia muy similar, incluso cuando se usan imágenes de microscopía electrónica de alta resolución. Ambos tipos de células son pequeñas (sólo ligeramente más grandes que los glóbulos rojos). Se observa muy poco citoplasma, ya que el núcleo ocupa la mayor parte de la célula. Los linfocitos existen como células redondeadas in vivo así como en cultivo celular. En condiciones normales de cultivo celular, los linfocitos no se adhieren al sustrato.

En esta práctica se eligieron **linfocitos HUT78** para representar a los leucocitos no adherentes. Estas células se derivaron de sangre periférica de un paciente con **síndrome de Sezary**, una leucemia caracterizada por una proliferación maligna de células T auxiliares. ¡Estas células han sido cultivadas durante 53 años! Se identifican por su pequeño tamaño, su forma redonda y su elevada relación nucleocitoplasmática. Son útiles para estudios del **Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)**, ya que son susceptibles a la infección por el virus.

### MACRÓFAGOS

Los **macrófagos** no muestran inhibición de contacto y se producen a través de la diferenciación de monocitos, un tipo de glóbulo blanco en mamíferos (**Figura 4**). Son células especializadas con responsabilidades en el **sistema inmune innato** y **adaptable**. Los macrófagos contribuyen a la respuesta inmune innata a través de la fagocitosis de materiales extraños (como microbios y fragmentos de células moribundas). En respuesta a patógenos, los macrófagos secretan citoquinas que a su vez activan el sistema inmune adaptativo. Los macrófagos son células altamente móviles; Se mueven a través del cuerpo de una manera ameboide, que les permite desplazarse al sitio de una infección o daño tisular.

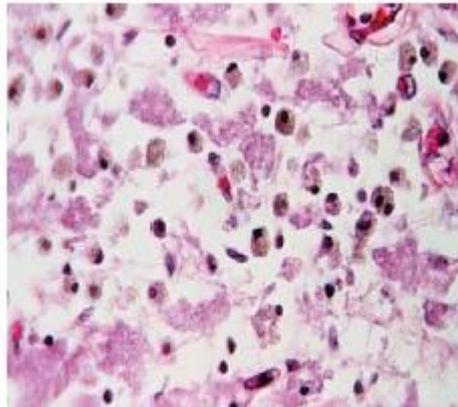


Figura 4: Macrófagos

Los macrófagos se estudian en cultivos por su papel en la inmunidad, pero también porque estas células están específicamente dirigidas a patógenos como la tuberculosis y el VIH. Tanto los macrófagos como los monocitos pueden adherirse al sustrato durante el crecimiento en cultivo, aunque no tan fuertemente como el epitelio y los fibroblastos. Esto da como resultado una célula de forma más esférica. Al igual que los fibroblastos y otros tipos de células mesodérmicas, los monocitos y los macrófagos pueden ser identificados por la presencia de vimentina.

En esta práctica, se usan **macrófagos AP388** de **Mus musculus** (ratón) como un representante de este tipo de células. Estas células se derivaron de un tumor linfóide generado por tratamiento con metilcolantreno, un carcinógeno conocido. Aunque se trata de una línea celular transformada, las células conservan las características de los macrófagos normales. Al igual que con los macrófagos primarios, estas células son activas en sistemas de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos y fagocitan zimosan y gotas de látex. Los macrófagos AP388 expresan receptores para

**inmunoglobulina** (Fc) y **complemento** (C3), que son necesarios para su función en la inmunidad.

También expresan el factor de crecimiento de la **interleuquina-1** (IL-1) cuando se estimulan con **lipopolisacárido** (LPS) o **ácido mirístico de forbol** (PMA) (Phorbol myristic acid, PMA).

## 4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

Esta práctica está diseñada para introducir a los estudiantes en el estudio de la estructura microscópica de las células (histología). Al finalizar esta práctica, los estudiantes podrán identificar varias líneas celulares principales examinando su morfología. Esto permite a los estudiantes conectar los conceptos de estructura celular con su función.

### 4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o la fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

### 4.2 Preparaciones previas

#### **Notas a los preparativos del profesor de la práctica**

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

#### **Registro de las actividades de laboratorio**

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Los alumnos que realicen esta práctica deben documentar su experimento en un cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que se podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

### 4.3 Material que debe recibir cada grupo

Distribuir el siguiente material a cada grupo de estudiantes, o preparar un área de trabajo común para que los estudiantes compartan los materiales:

- 1 portaobjetos para teñir
- Reactivo de fijación
- Reactivos de tinción (colorantes azul de metileno y eosina)
- Medio de montaje
- 3 pipetas de transferencia
- 1 par de pinzas
- Agua destilada (50 ml)
- Toallas de papel (o Kimwipes)

### 4.4 Evitar los errores más comunes

1. Los estudiantes han de tener **mucho cuidado** al transvasar soluciones dentro y fuera de los campos de reacción circular de los portaobjetos.
2. Usar solo pipetas limpias y correctamente marcadas y evitar la contaminación de los pocillos adyacentes.
3. No intentar vaciar los campos de reacción circulares agitando los portaobjetos.
4. Lavar y secar los campos de reacción circulares de los portaobjetos con cuidado y lentamente, sin frotar la superficie.

## 5. PRÁCTICA

### **Procedimiento de tinción**

1. FIJAR el portaobjetos que contienen células adheridas colocando dos o tres gotas de agente de fijación en cada campo de reacción circular (en la cara de la superficie esmerilada del portaobjetos). Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.



2. SECAR el portaobjetos al aire (si es posible bajo una campana o cubiertos).
3. AÑADIR, con una pipeta de transferencia, una o dos gotas de colorante azul (azul de metileno) en cada campo de reacción circular del portaobjetos que contienen las células.
4. INCUBAR el portaobjeto durante 7 minutos a temperatura ambiente.
5. ELIMINAR aspirando el colorante azul de metileno con la misma pipeta de transferencia utilizada en el punto 3. No lavar.
6. AÑADIR una gota de colorante rosa (eosina) en los campos de reacción circular. INCUBAR durante 30 segundos a temperatura ambiente.
7. LAVAR brevemente el portaobjetos en un vaso con agua destilada (o del grifo). SECAR suavemente los portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de agua. Montar los portaobjetos colocando una pequeña gota de medio de montaje sobre los campos de reacción circular, luego colocar cuidadosamente el cubreobjetos en la parte superior.
8. OBSERVAR con un microscopio el montaje.

### Observación microscópica

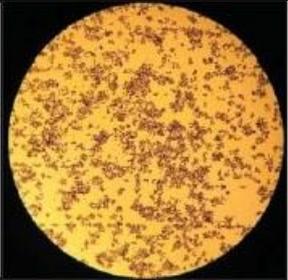
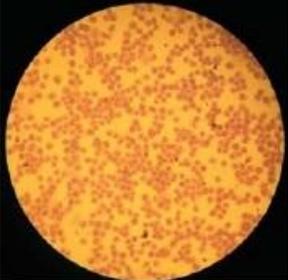
1. Utilizando el objetivo de menor aumento (10x o 20x), observar la morfología general de cada tipo de célula, centrar la observación en la zona central de los campos de reacción circular del portaobjetos. ¿Son densas o escasas las células? ¿Redondas o poligonales? ¿Con forma regular o irregular?
2. Cambiar a un objetivo de mayor aumento, lo que permitirá ver más detalles del cultivo.
3. Clasificar cada tipo de célula como fibroblastos, queratinocitos, linfocitos o macrófagos. Registrar las observaciones en la tabla anexa.
4. ¿Cuál es la forma del núcleo? ¿Cuál es el tamaño relativo del núcleo en comparación con el citoplasma? Registrar las observaciones en la siguiente tabla.

Tipo de célula	Observación a bajo aumento	Observación a elevado aumento	Clasificación
1			
2			
3			
4			

## 6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

### 6.1 Resultados

El orden de las células en la diapositiva desde el extremo mate (esmerilado): macrófagos, linfocitos, fibroblastos, queratinocitos.

Tipo de célula	Observación a bajo aumento	Observación a elevado aumento	Clasificación	Foto
1	Grupos de células redondas	De tamaño grande, las células son mononucleares	<b>Macrofágos</b>	
2	Grupos de células circulares	Células casi sin color, no granulares	<b>Linfocitos</b>	
3	Células poligonales y de forma irregular	Células planas y alargadas	<b>Fibroblastos</b>	
4	Relativamente simétricas, morfología en forma de media luna	Núcleo oscuro en el centro	<b>Queratinocitos</b>	

## 6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. ¿Cómo se relaciona la morfología de cada tipo de célula con su función?
2. Dé un ejemplo de epitelio estratificado externo, y otro de epitelio estratificado interno.
3. ¿Qué tipos de células se encuentran dentro de la sangre? ¿Qué tipos de células se encuentran dentro de los tejidos?
4. ¿Qué tipos celulares son los más grandes? ¿El más pequeño? ¿Cuál sería la ventaja de una célula más pequeña?
5. ¿Cuáles son las células más adherentes (más planas)? ¿Las menos adherentes? ¿Cuál es la ventaja de cada uno?

**Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros [info@bioted.es](mailto:info@bioted.es)**