

CITOLOXÍA

INTRODUCCIÓN Á CÉLULA



Carmen Cid Manzano

I.E.S. Otero Pedrayo. Ourense. Departamento Bioloxía e Xeoloxía.

MOMENTOS HISTÓRICOS NA BIOLOGÍA CELULAR

Robert Hooke
observa células
de un árbol de corcho
con un microscopio primitivo

Leewenhoek
descubre
las bacterias

1655 1683

1674

Leewenhoek
descubre
los protozoos

Koch usa pigmento de anilina
para identificar las bacterias
causantes de la TB y el cólera

Kolliker
describe
las mitocondrias
en el músculo

1857

1833

Brown descubre
el núcleo

Shleiden
y Schwann
proponen
la Teoría Celular

1838

Golgi tiñe células
con nitrato de plata,
descubriendo el
aparato de Golgi

1882

1898

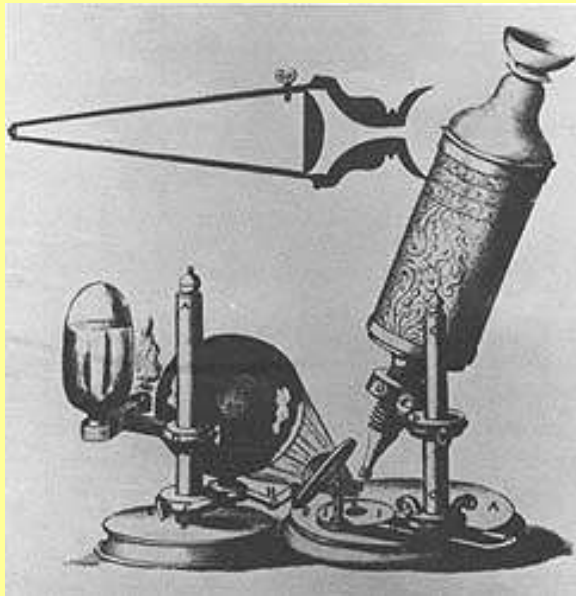
Ruska construye
el primer
microscopio electrónico
de transmisión

1931

Clonación
de la Oveja

1965

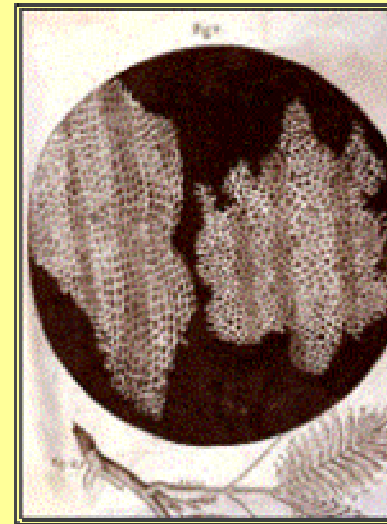
1er microscopio
electrónico
de barrido comercial



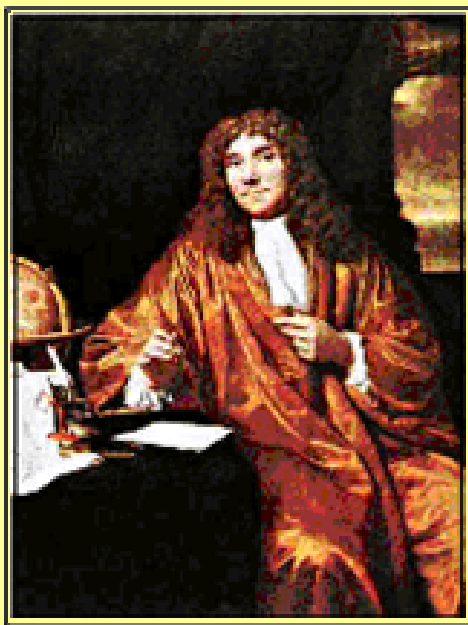
Microscopio utilizado por Robert Hooke (1665)



ROBERT HOOKE

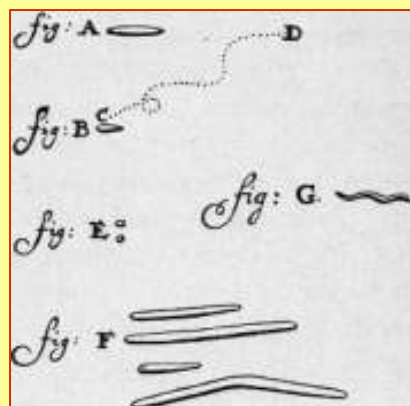
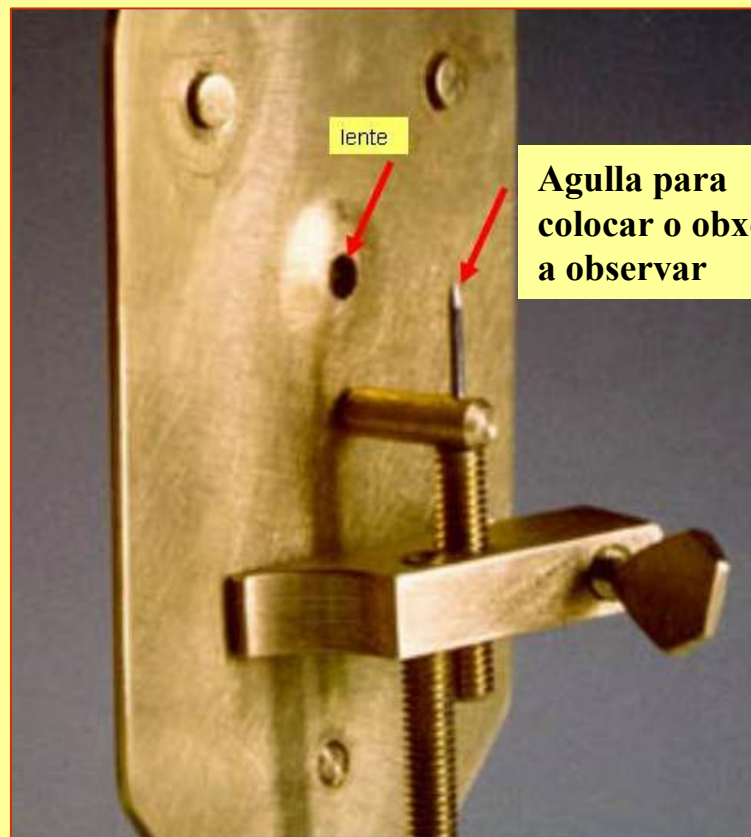


descubre no corcho pequenas celdiñas ás que chamou células



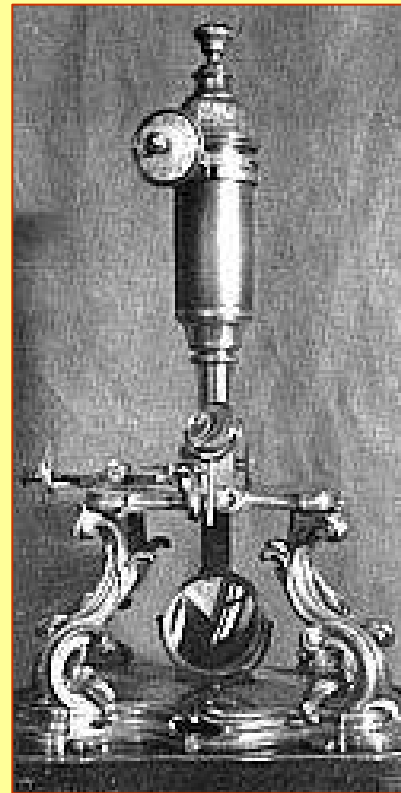
ANTON VAN LEEUWENHOEK

En 1674 Leuwenhoek observou hematórias, espermatozoides, protozoos e mesmo describiu unha bacteria.



Esquemas dos microorganismos obsevados por **Leuwenhoek**

Durante o século XVIII o microscopio sufriu diversos adiantos mecánicos que aumentaron a súa estabilidade e facilidade de uso aínda que non desenvolveron grandes melloras ópticas.

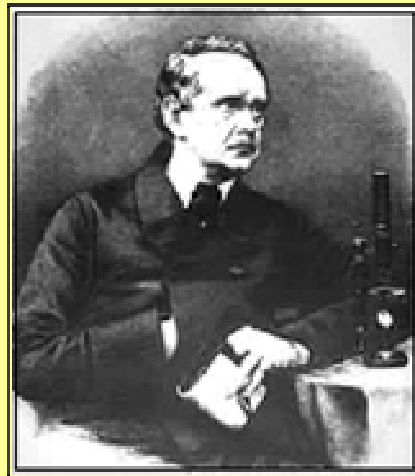




As melloras máis importantes da óptica xurdiron en 1877 cando Abbe publica a teoría do microscopio e por encargo de Carl Zeiss mellora a microscopía de inmersión substituíndo a auga por aceite de cedro o que permite obter maiores aumentos.

A TEORÍA CELULAR

A teoría celular está ligada á invención das lentes e á construción dos microscopios que permitiron ter unha visión moi ampliada destas estruturas, podendo observar características totalmente imperceptibles ó ollo humano.



MATTHIAS SCHLEIDEN



THEODOR SCHWANN

1825 **Schleiden** y **Schwann** enuncian a primeira teoría celular segundo a cal, a célula é a unidade estrutural e funcional dos seres vivos, capaz de manter unha existencia propia e independente.

1858 **Virchow** completa o postulado anterior afirmando que todas as células orixínanse a partir dunha preexistente.



RUDOLF VIRCHOW

Actualmente, a teoría celular postula os seguintes principios:

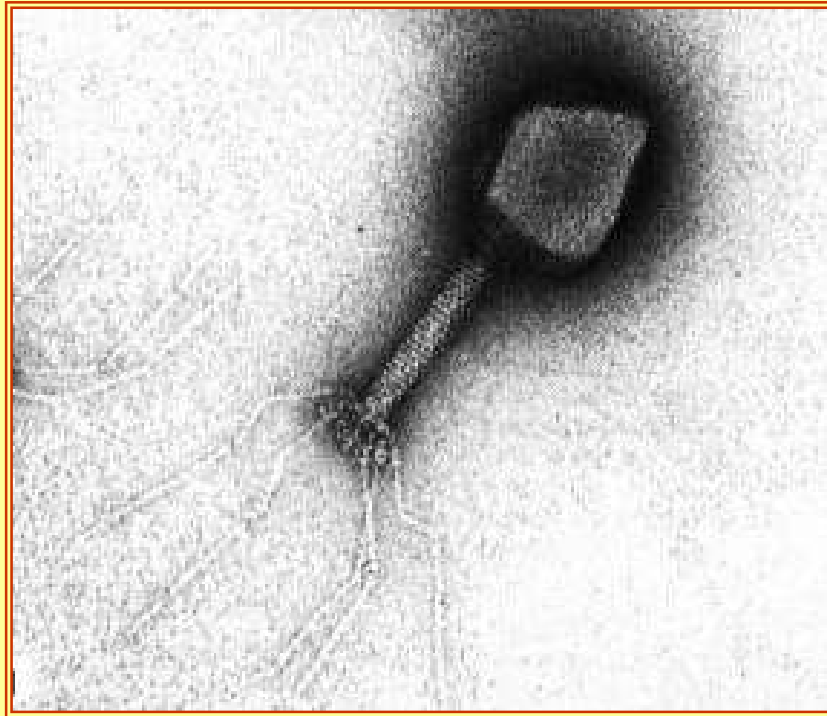
- Todos os seres vivos están compostos por unha ou varias células vivas (unidade anatómica).
- As células son capaces de manterse de forma independente (unidade fisiolóxica).
- Cada célula procede doutra xa existente, o que permite a transmisión de caracteres dunha xeración á seguinte (unidade reprodución).
- A célula é a unidade de vida máis pequena que existe.



SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Durante case 50 anos a aplicación da teoría celular a todos os tecidos animais e vexetais aínda mantivo un punto de dúbida: o tecido nervioso, polo seu aparente aspecto de rede continua.

O español ***Ramón y Cajal*** demostrou a individualidade da célula nerviosa e polo tanto a xeneralización da Teoría celular a todos os tecidos.



Unha excepción da teoría celular
Son os virus xa que se tratan de
organismos acelulares.

Bacteriófago (virus que parasita a bacterias)

¿Como se estudian as células?

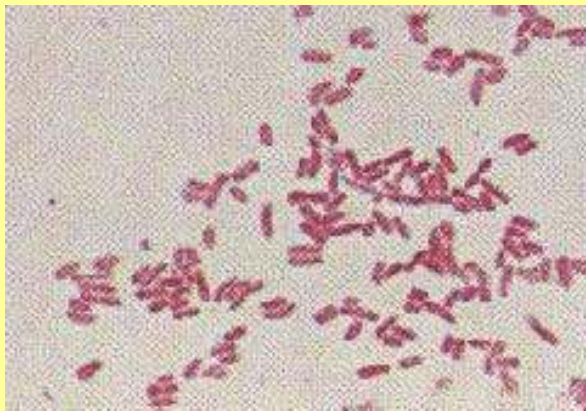
Microscopia óptica



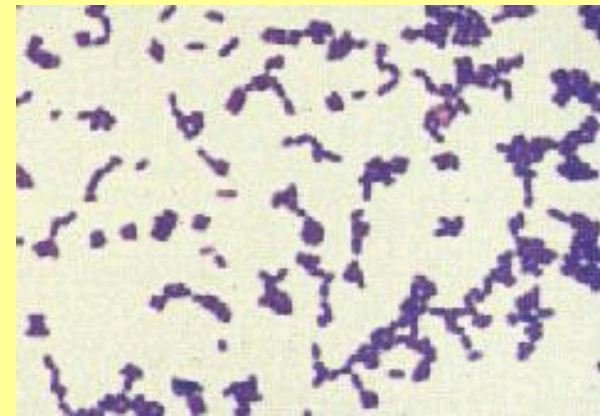
Microscopio óptico



Células eucariontes tratadas con colchicina



Gram negativo



Gram positivo

Calidade da imaxe

1. Aumentos
2. Contraste
3. Resolución

Aumentos

Aumento dun microscopio é a relación entre o tamaño da imaxe que vemos e o tamaño real

Obxectivos (normalmente 10x, 40x, 100x)
Ocular (normalmente 10x)

Número total de aumentos: 100, 400, 1000

Aínda que o AUMENTO é moi importante, non sempre é suficiente para que apreciemos os detalles dun obxecto. Os outros dous factores que afectan a nosa capacidade para ver unha imaxe de calidade son o CONTRASTE e A RESOLUCIÓN

O CONTRASTE permítenos

*diferenciar o obxecto do fondo

*apreciar distintas partes do mesmo

Para obter unha imaxe útil é necesario aumentar o contraste tinguindo a célula.



**Microorganismos tinguidos. Microscopio óptico
composto. Mezcla de bacterias e levaduras**

Outra estratexia: Tinción negativa



Microorganismo (Levadura) sen tinguir. Tinguido do fondo

Algúns tipos de microscopios ópticos teñen dispositivos para aumentar o contraste sen necesidade de tinguir.

Microscopio de contraste de fases
Microscopio de campo escuro



Microscopio de contraste de fases



Microscopio de campo escuro

RESOLUCIÓN

O límite de resolución dun microscopio é a mínima distancia á que ten que estar dous puntos para que na imaxe se perciban separados un doutro.

O poder de resolución é a capacidade que pose un microscopio de separar dous puntos moi preto, no campo visual como entidades diferentes. É o inverso do límite de resolución. É maior canto menor é o límite de resolución



Algún tipos de microscópios

Microscopio óptico campo claro

Microscopio óptico campo oscuro

Microscopio óptico contraste de fases

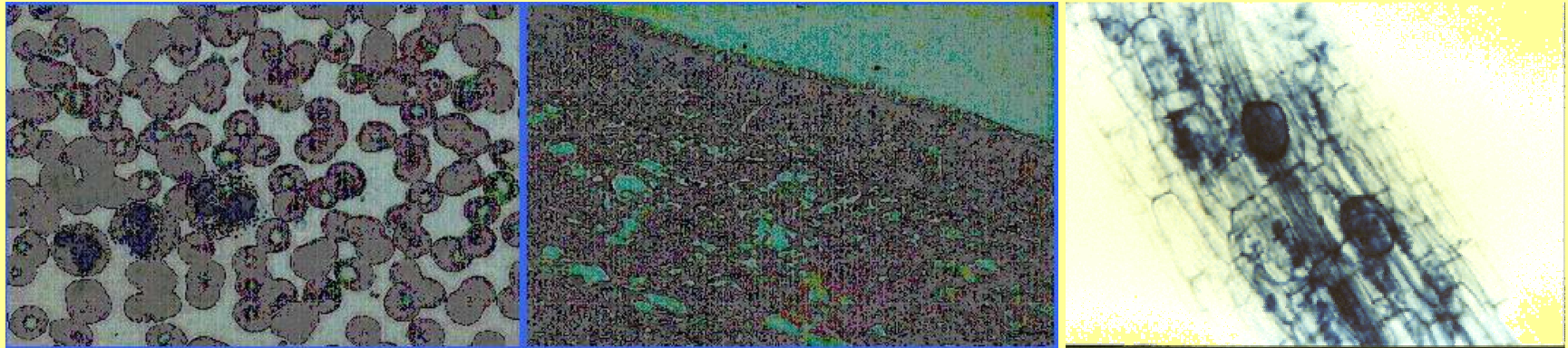
Microscopio de Interferencia (DIC)

Microscopio de fluorescencia

Microscopio electrónico

Microscopio de campo claro

É o microscopio óptico composto utilizado na maioria dos laboratorios. Para formar unha imaxe a partir dun corte histolóxico usa luz visible, por isto a mostra debe ser o bastante fina como para que os feixe de luz podan atravesala. Tamén se usan métodos de tinguir, segundo as necesidades, co fin de aumentar os detalles na imaxe.



Células sanguíneas, Células da Traquea e micorrizas

O Microscopio Óptico



Sistema óptico

OCULAR: Lente situada cerca do ollo do observador. Amplía a imaxe do obxectivo.

OBXECTIVO: Lente situada cerca da preparación que amplía a súa imaxe.

CONDENSADOR: Lente que concentra os raios luminosos sobre a preparación.

DIAFRAGMA: Regula a cantidade de luz que entra no condensador.

FOCO: Dirixe os raios luminosos ó condensador.

Sistema mecánico

SOPORTE: Mantén a parte óptica. Ten dúas partes: o pe ou base e o brazo.

PLATINA: Lugar onde se deposita a preparación.

CABEZAL: Contén os sistemas de lentes oculares. Pode ser monocular, binocular...

REVÓLVER: Contén os sistemas de lentes obxectivos. Permite, ó xirar, cambiar os obxectivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima o enfoque e micrométrico que consigue o enfoque correcto.



O microscopio monocular

Consta dun tubo ocular e chámase así porque a observación se fai cun só ollo.



O microscopio estereoscópico

Ten dous obxectivos e dous oculares, isto presenta vantaxes tales como mellor percepción da imaxe, máis cómoda a observación e percíbense con maior nitidez os detalles. Fai posible a visión tridimensional. Este microscopio ten a vantaxe que non inverte a imaxe, é fácil de enfocar e pode usarse para obxectos opacos que non vaian montados sobre portaobxectos.

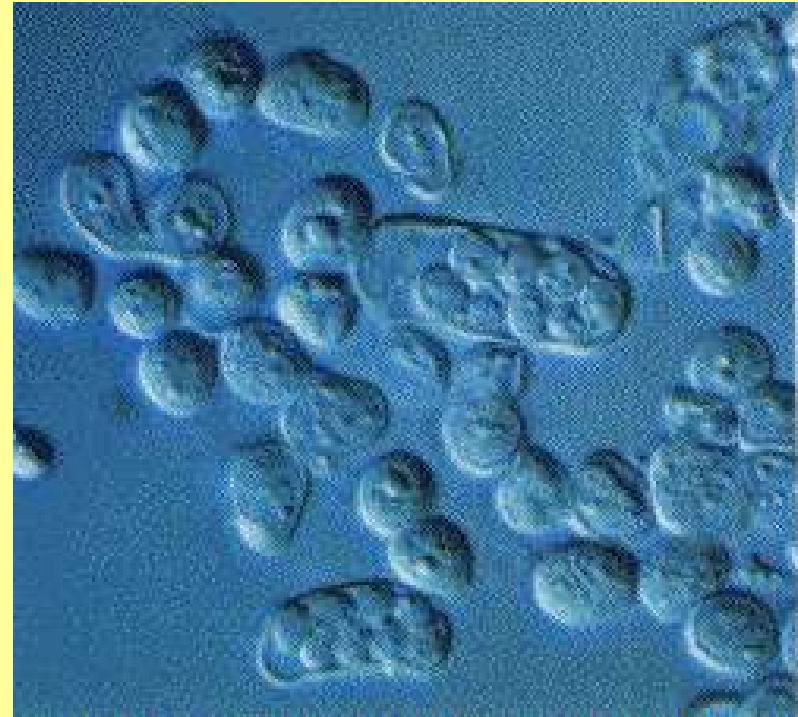


Microscopio de campo escuro



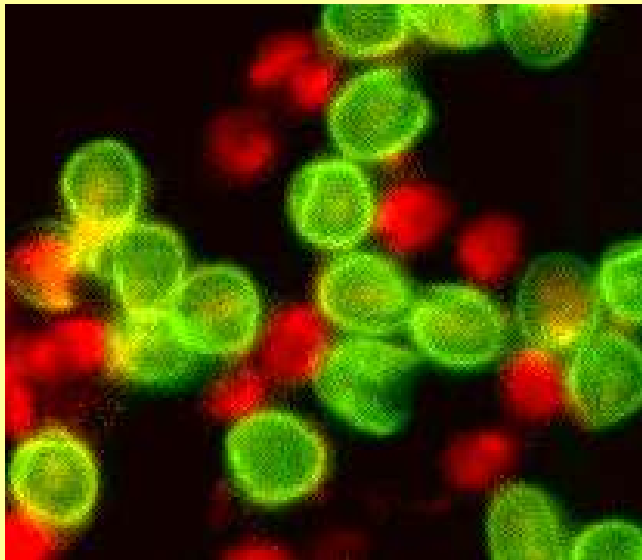
Microscopio de contraste de fases

Permite observar células sen colorear e resulta especialmente útil para células vivas



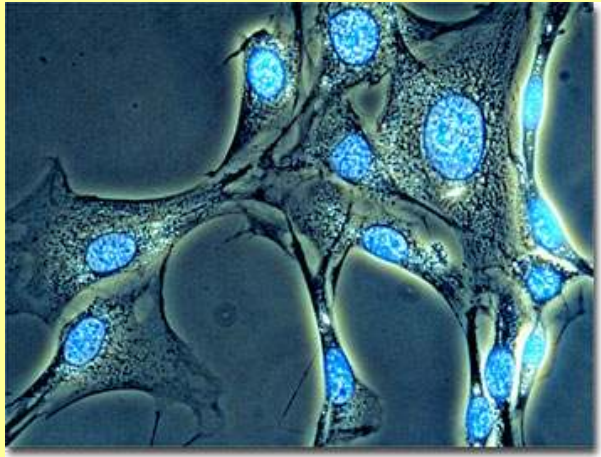
Microscopio de contraste diferencial de interferencia (DIC) é unha modificación do anterior que permite apreciar unha imaxe tridimensional.

Microscopio de Fluorescencia

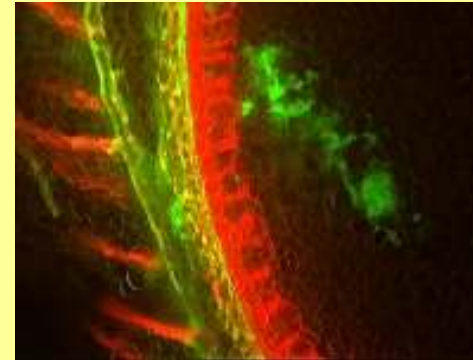


Pódense realizar observacións de estruturas fluorescentes, xa sexan naturais ou artificiais.

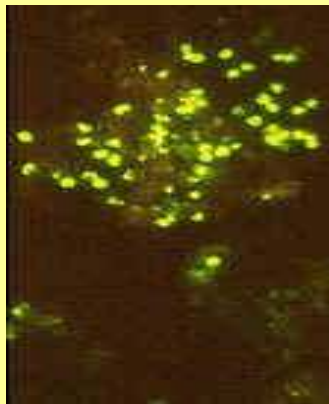
Microscopía de fluorescencia.



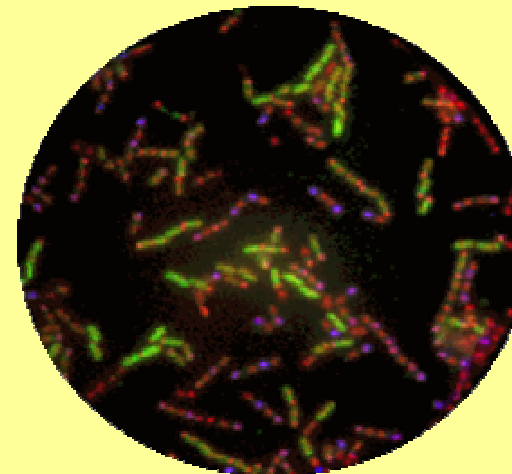
Fibroblastos
tinguidos co
fluorocromo
FITC



Endosperma
sendo
colonizada
por
bacterias



Bacterias en fumarolas mariñas
adheridas a un cristal de sulfuro



Bacillus subtilis esporulando
tinguidos con FITC, DAPI e
 β galactosidasa.

O Microscopio Electronico de Transmisión(MET)

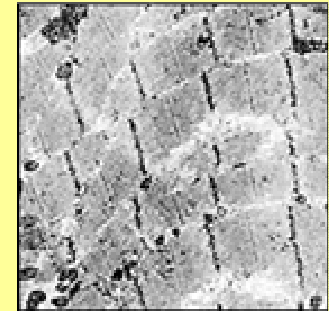


O Microscopio Electronico de Barrido (MEB)

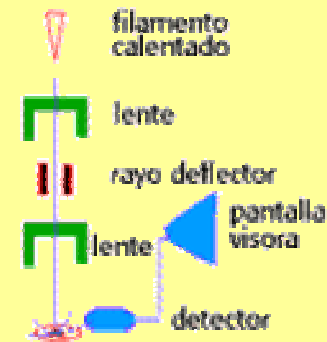
ME de transmisión



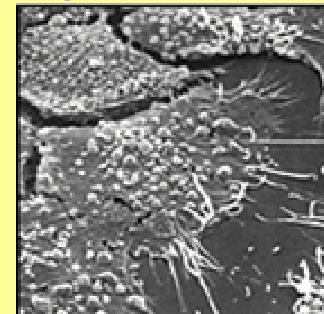
MET en tejido muscular



ME de barrido

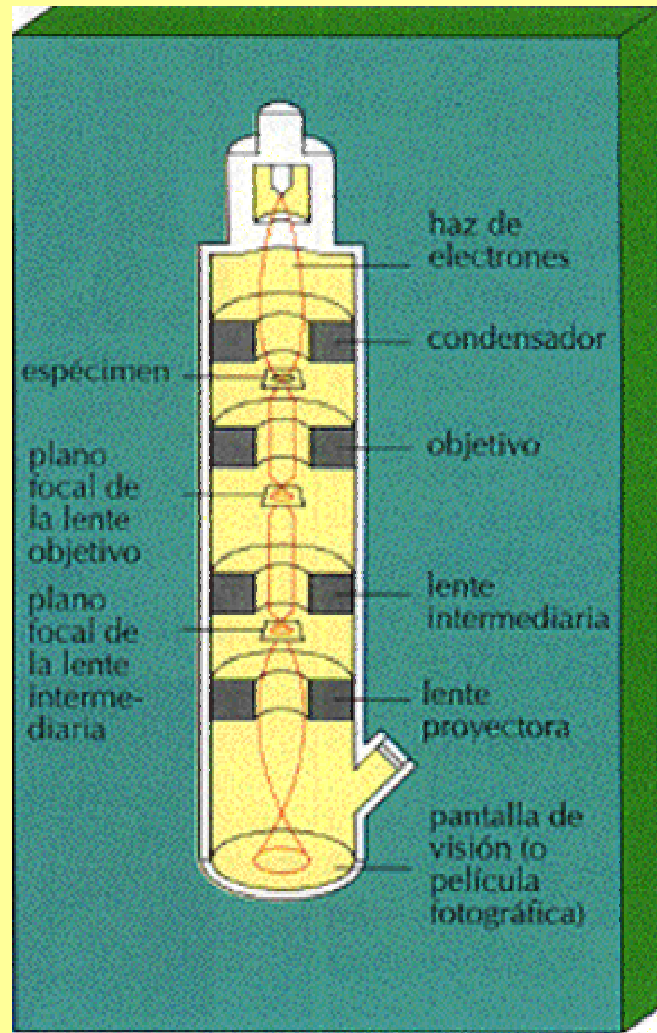


MEB de células hepáticas estresadas



O MET e o MEB ten un limite de resolución de cerca de 2 nm. Obsérvanse células mortas despois de fixadas e tinguidas con ións de metais pesados. Utilízase para observar ultraestructuras celulares chegando ós 100.000 aumentos.

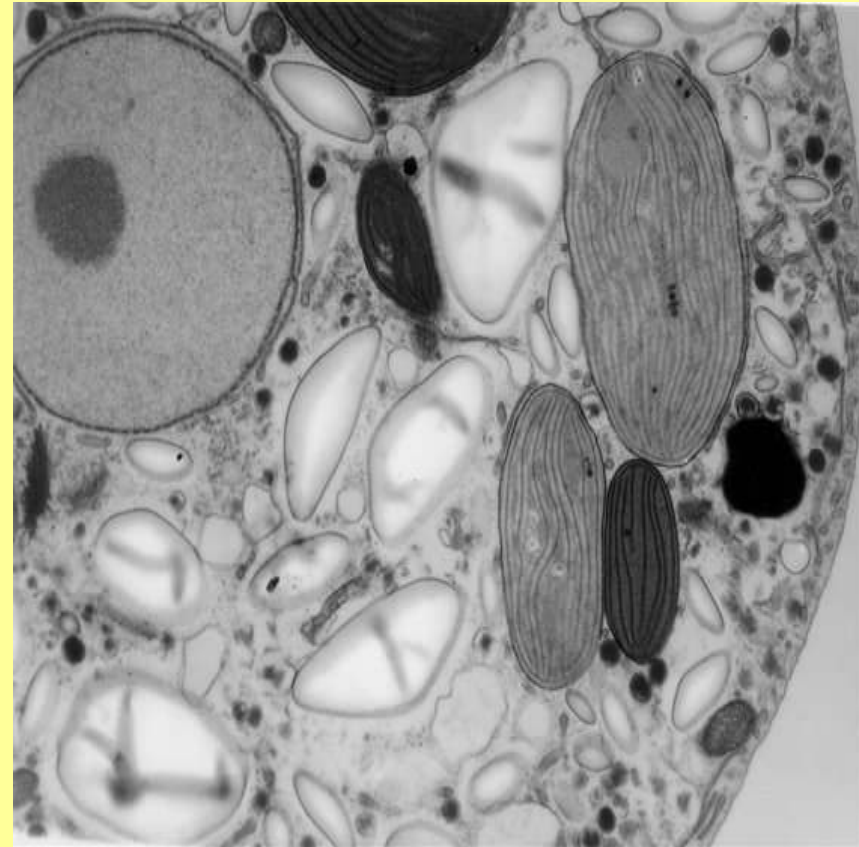
Microscopio Electrónico de Transmisión(MET)



Os e- atraviesan a mostra



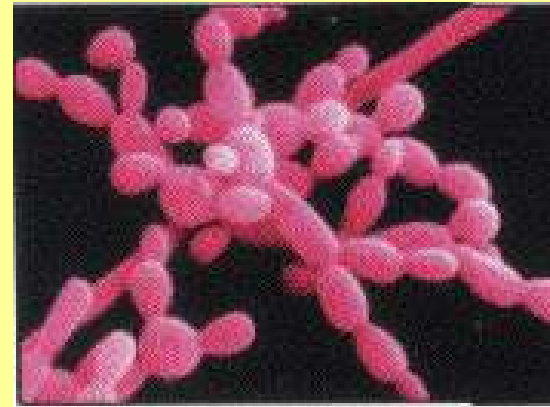
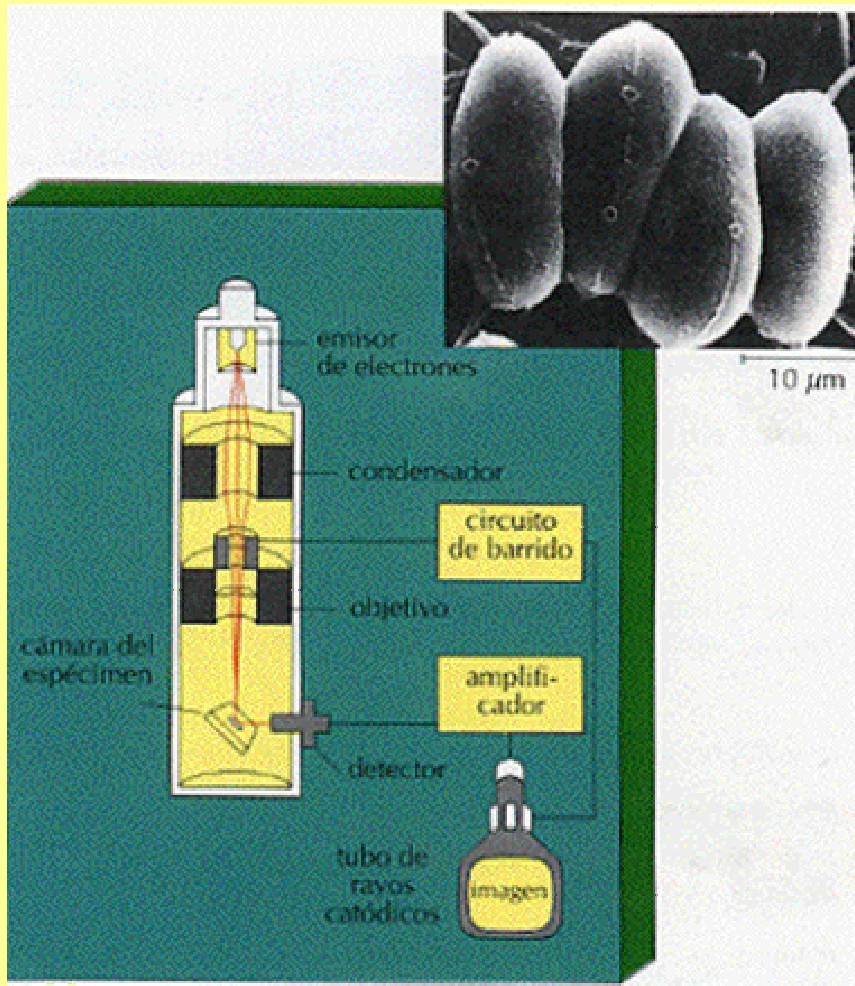
Microscopia electrónica de transmisión.



Microscopia dun alga roxa antes de formar a súa parede

Microscopio electrónico de Barrido (MEB)

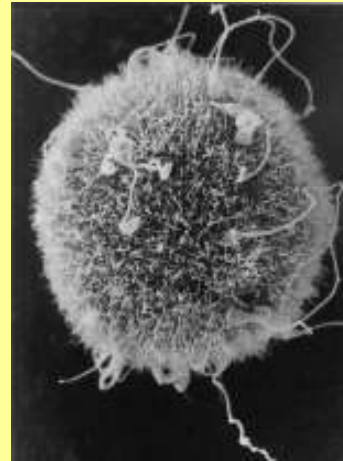
Los e- recorren a mostra



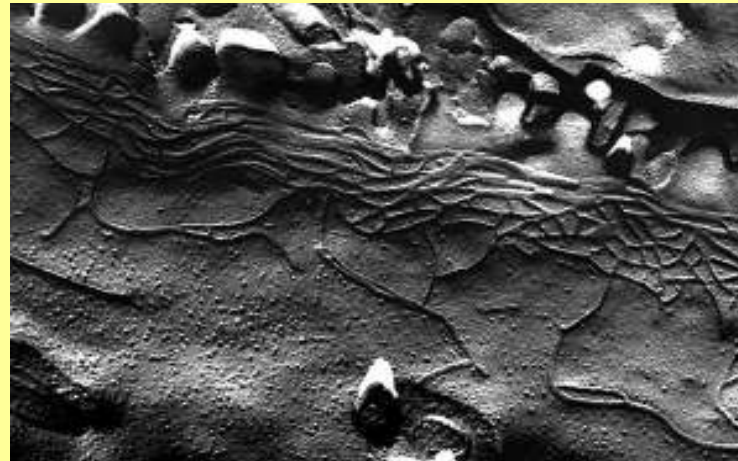
Imaxe en tres dimensiones



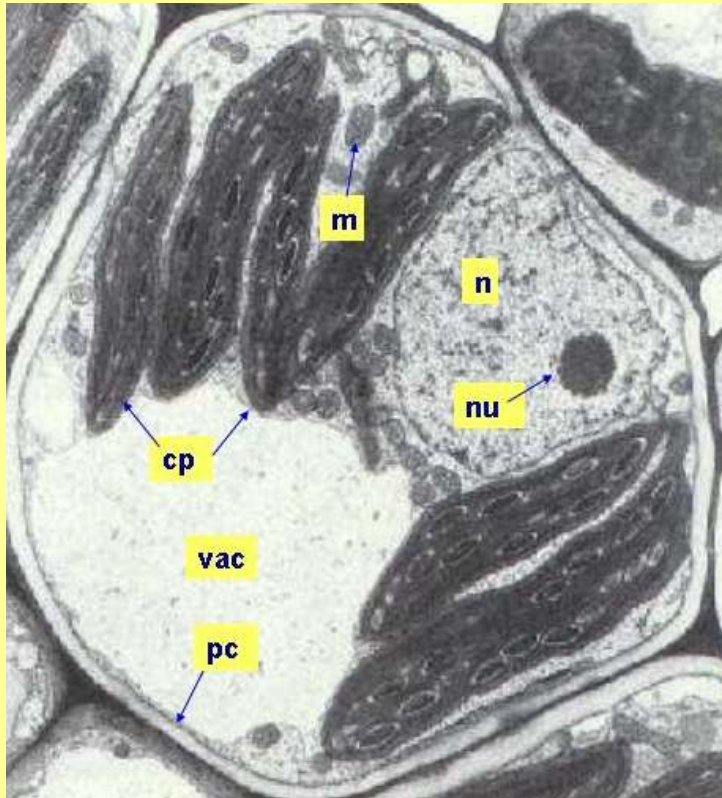
Microscopia electrónica de barrido.



Óvulo de hamster
sen zona pelucida
con espermatozoides

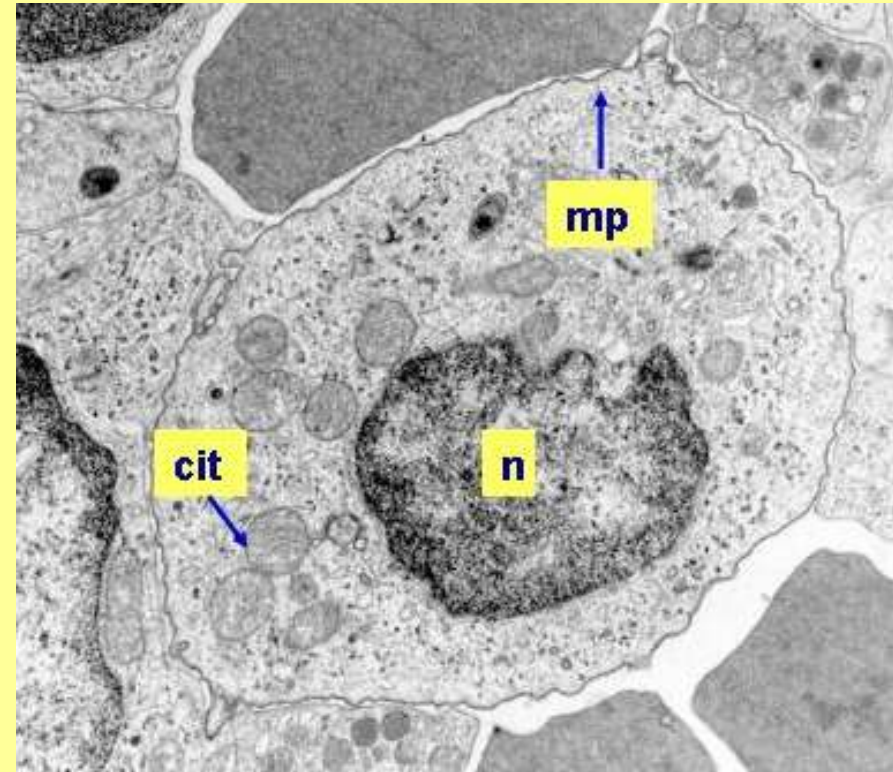


Criofractura de epitelio gástrico vista
polo MEB



Célula vexetal
ó microscopio electrónico

n = núcleo
nu = nucleolo
vac = vacuola
cp = cloroplasto
pc = pared celulósica



Célula animal
ó microscopio electrónico

mp = membrana plasmática
cit = citoplasma
n = núcleo

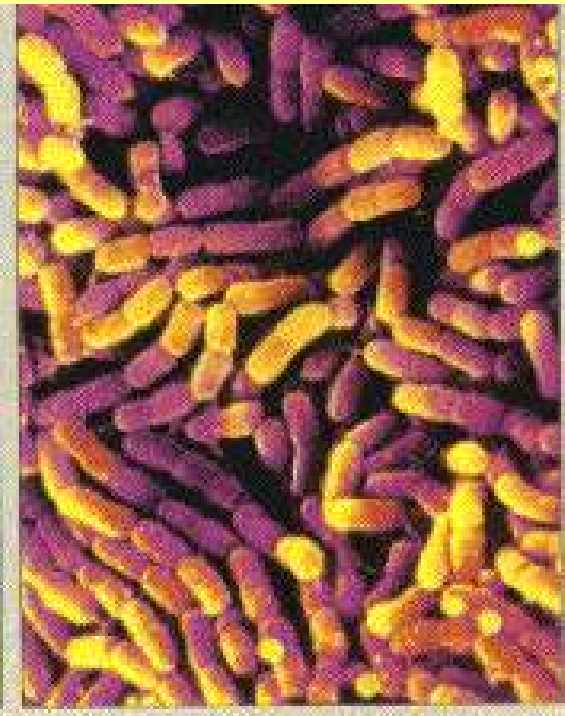
E.coli



M. óptico

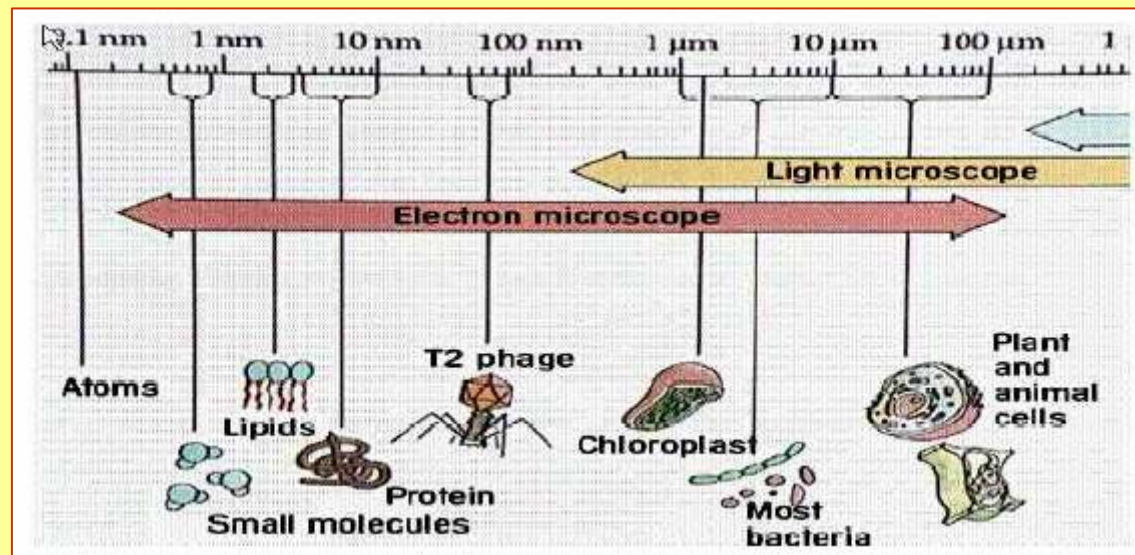
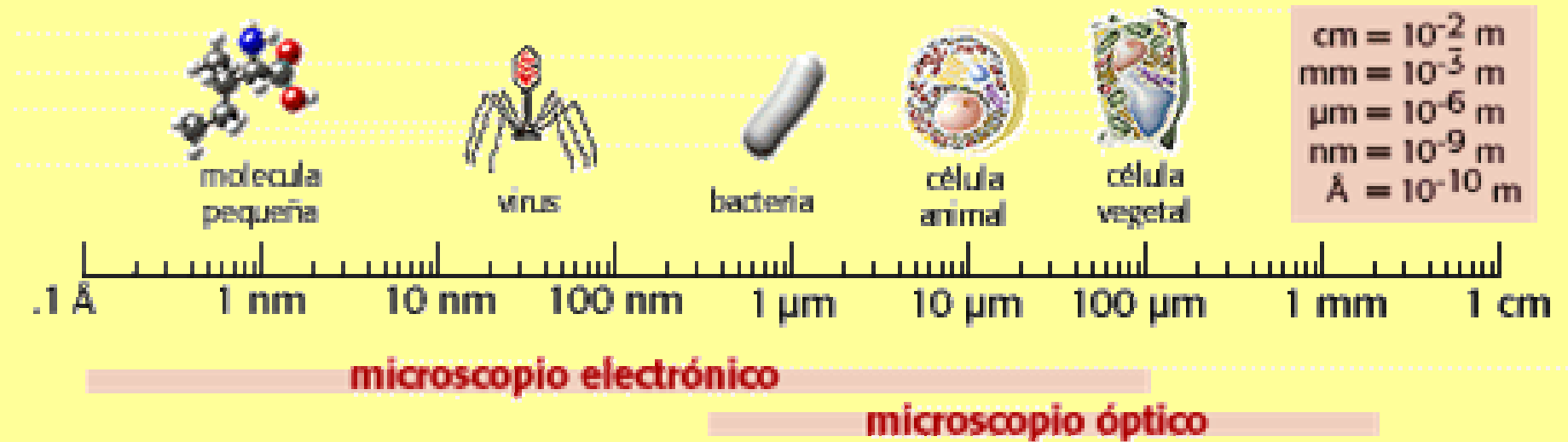


MET



MEB

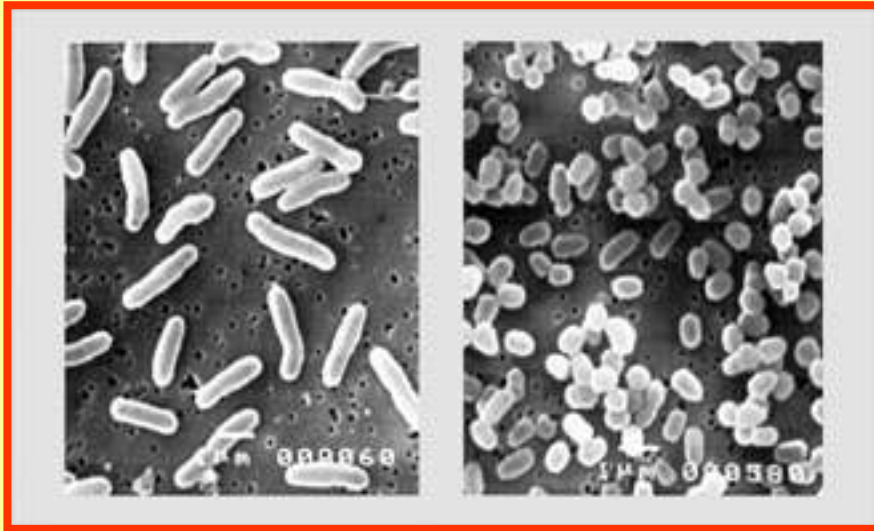
| Tipo de Microscopio | Máxima Ampliación | Límite de Resolución | Características Especiales | Apariencia del Especimen | Aplicaciones más útiles |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|---|
| Campo claro ÓPTICO | 1000-1500 | 0,2-0,3 μm | | Color del colorante Claro (tinción neg) | Morfología grosera Cápsulas |
| Campo oscuro ÓPTICO | 1000-1500 | 0,2-0,3 μm | Condensador especial | Brillante en fondo oscuro | Microorganismos vivos (espiroquetas) |
| Luz uv ÓPTICO | 1000-1500 | 0,2-0,3 μm | Condensador y Objetivo CUARZO | Brillante en pantalla | --- |
| Fluorescencia ÓPTICO | 1000-1500 | 0,2-0,3 μm | Condensador CUARZO | Brillante fluorescente | Diagnóstico Identificación |
| Contraste de Fases ÓPTICO | 1000-1500 | 0,2-0,3 μm | Condensador Anillo cambiador de fase | Tonos de gris | Estructuras y Movimiento |
| Electrónico Transmisión | 200.000-1.000.000 | 0,1 nm | Haz de e- Lentes electromagnéticas | Grises en Pantalla fluorescente | Ultraestructuras y Virus |
| Electrónico Barrido | 10.000-100.000 | 1-10 nm | idem | Tridimensional | idem |



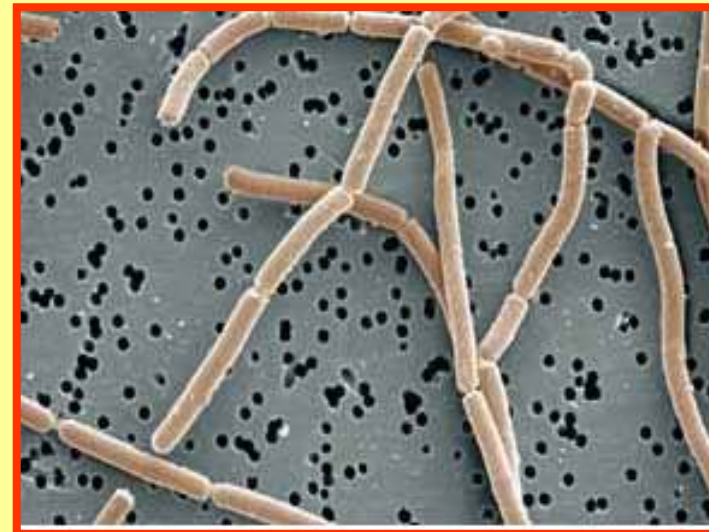
TIPOS DE ORGANIZACIÓN CELULAR

- Célula procariótica
- Célula eucariótica

□ **Célula procariótica**



Archaeas. Bacterias extremófilas



Lactobacillus bulgaricus

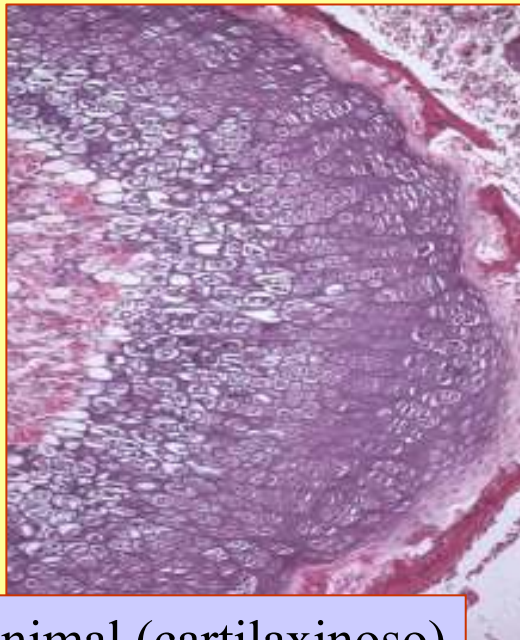
☐ Células eucarióticas



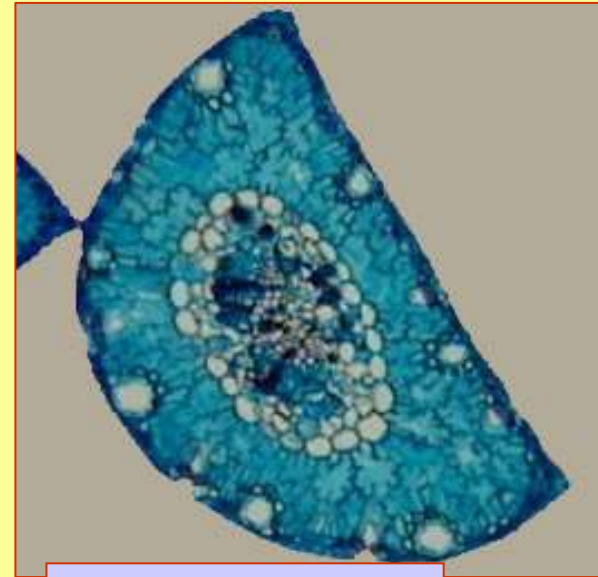
Organismo unicelular ameba



Organismo unicelular ciliado



Tecido animal (cartilaxinoso)



Tecidos vexetais

MÉTODOS MÁIS FRECUENTES DE ESTUDIO DOS CONSTITUENTES CELULARES

Cultivo celular: permite estudiar *in vitro* actividades celulares como a endocitose, movemento celular, reprodución celular, transporte ó través da membrana, etc.

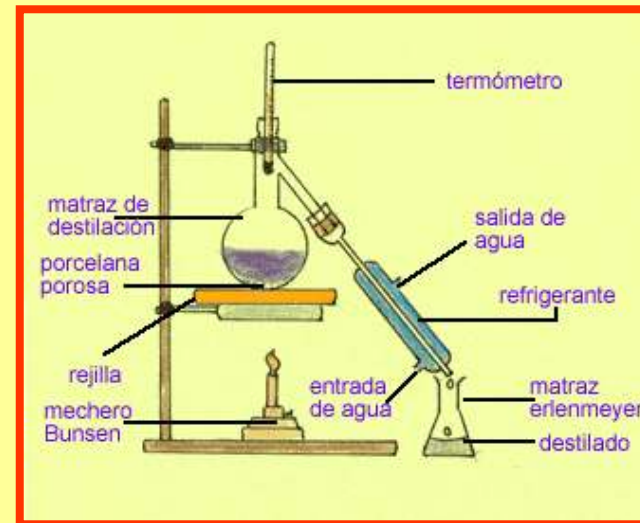
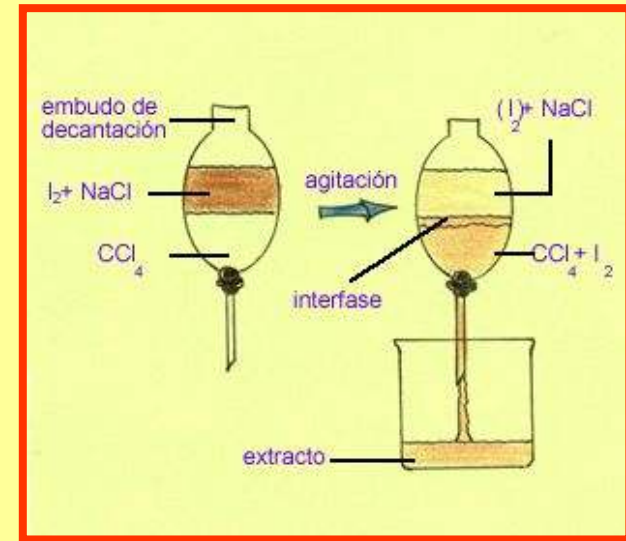
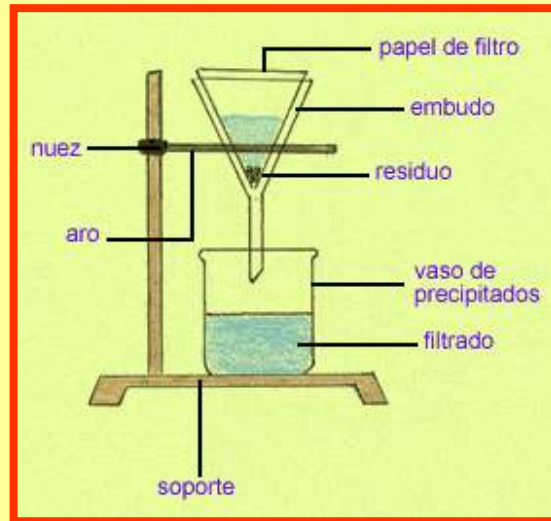


Análise químico: permite a identificación de biomoléculas, por exemplo identificación de glúcidos co reactivo de Fheling, proteínas mediante a reacción de Biuret, etc.



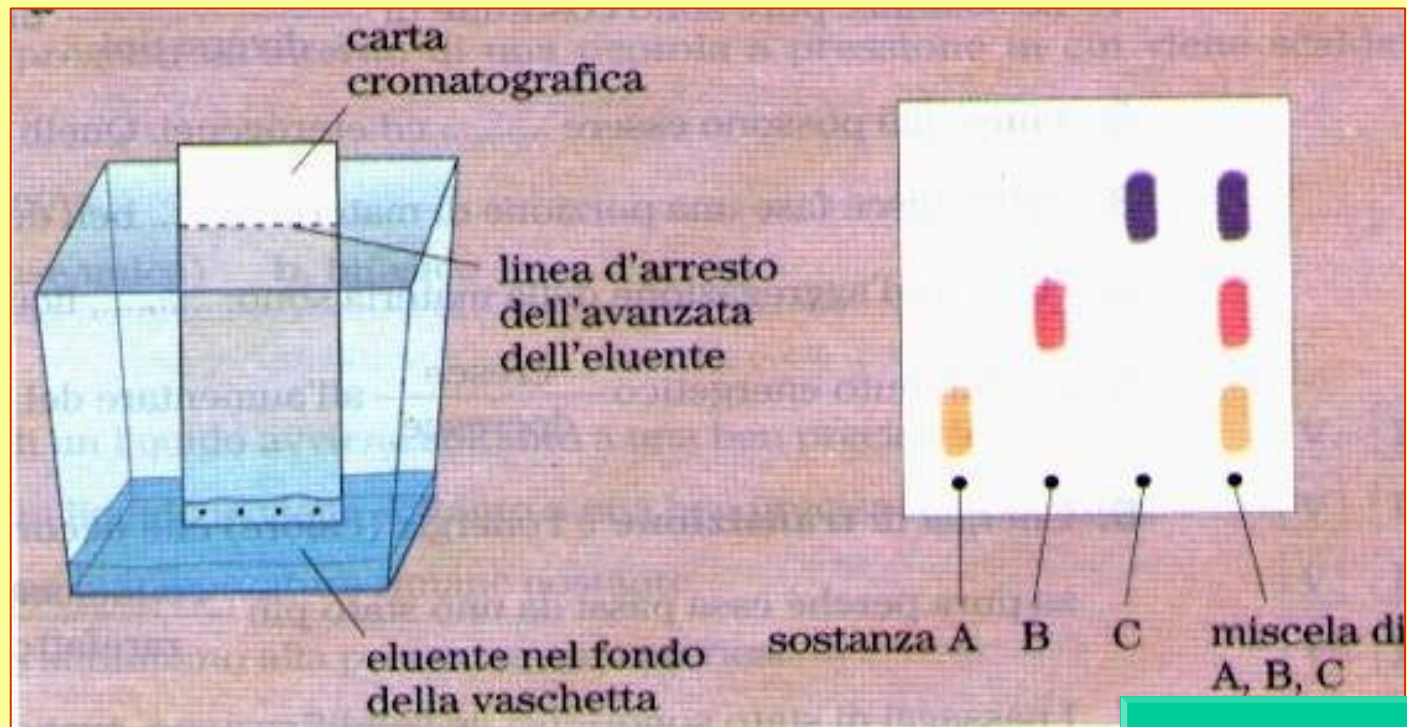
Métodos físicos:

- Filtración
- Decantación
- Destilación
- Cromatografía
- Electroforesis
- Centrifugación
- Técnica de radioisótopos
- ...



CROMATOGRAFÍA

Conxunto de técnicas destinadas a fraccionar unha mezcla de compoñentes disoltos a medida que se desprazan ó través dunha matriz porosa. A técnica en xeral baséase na diferente afinidade que teñen as moléculas por un disolvente e pola trama porosa da matriz a través da que flúen.

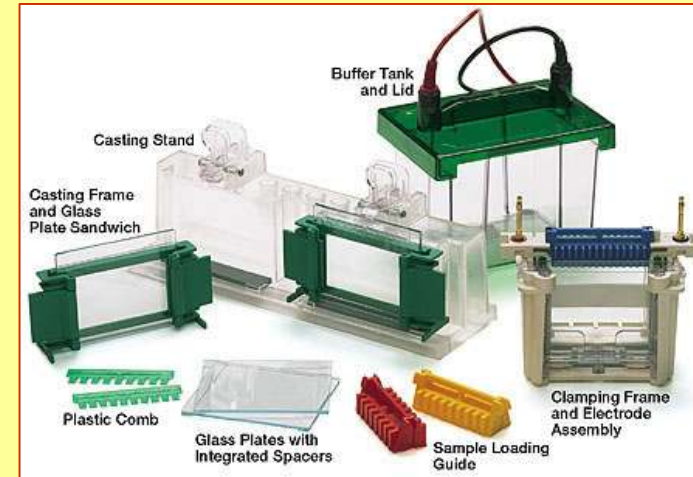
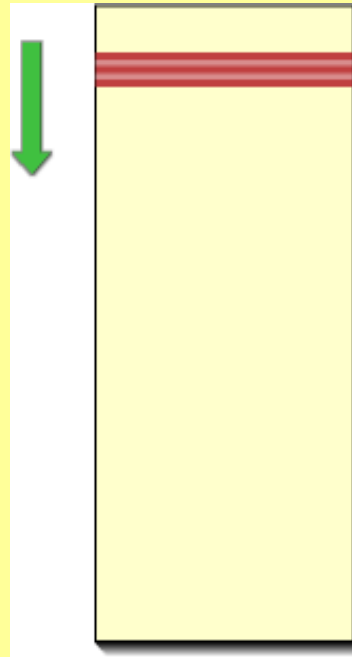


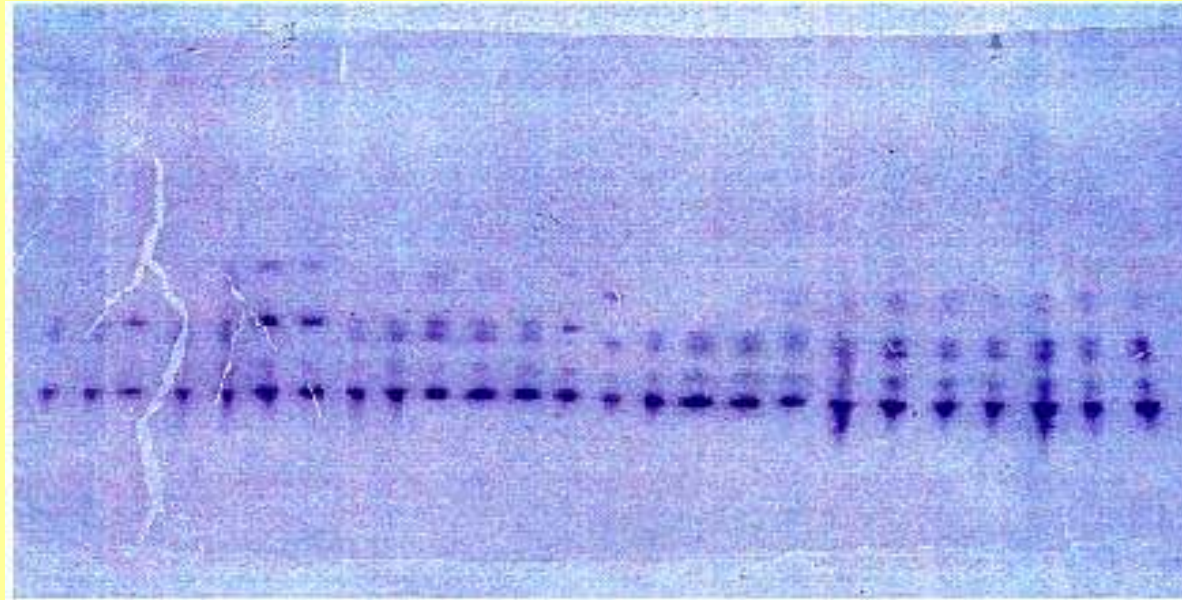
Cromatografía

ELECTROFORESE

É a técnica pola que mezclas complexas de moléculas como proteínas, ADN ou ARN sepáranse nun campo eléctrico de acordo ó tamaño e a súa carga eléctrica.

A electricidade empuxa as moléculas ó través dos poros dun xel, que é unha substancia firme como a xelatina. As moléculas máis pequenas migran máis rápido que as máis grandes.

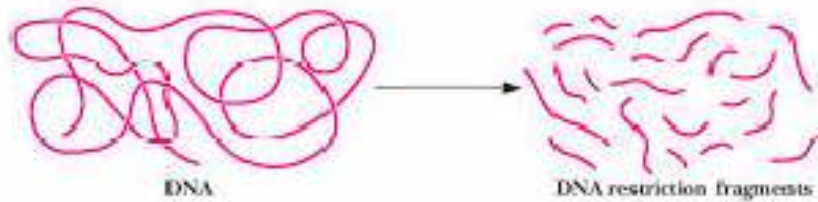




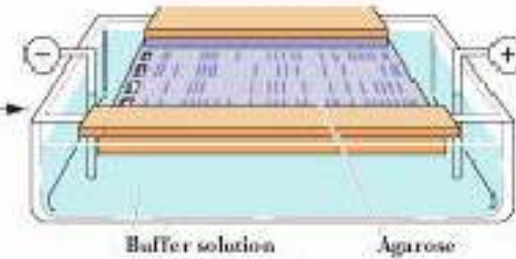
Gel de poliacrilamida tinguido con azul de Coomassie

Por exemplo as proteínas poden visualizarse sobre o xel tinguidas coa prata ou cun colorante como o azul de Coomassie que revela unha serie de bandas.

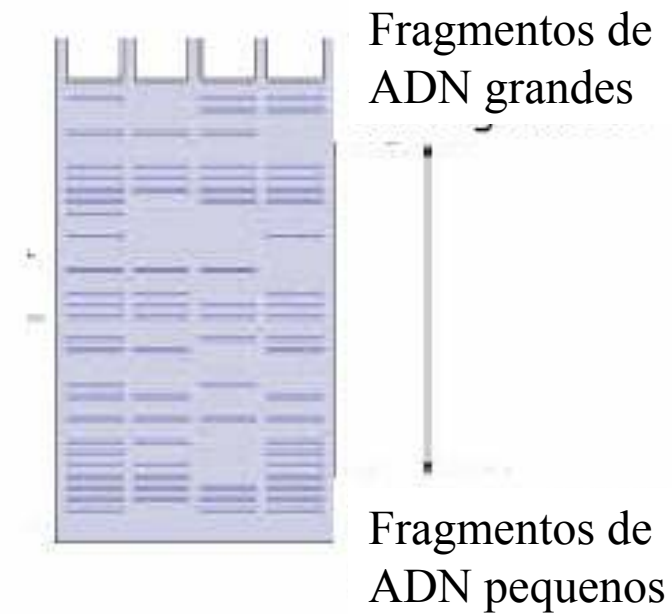
Rotura do ADN por encimas de restricción



Electroforese dos fragmentos de ADN en xel de agarosa



As bandas poden visualizarse ó tinguir o xel con bromuro de etidio, que presenta unha intensa fluorescencia laranxa



Electroforese I

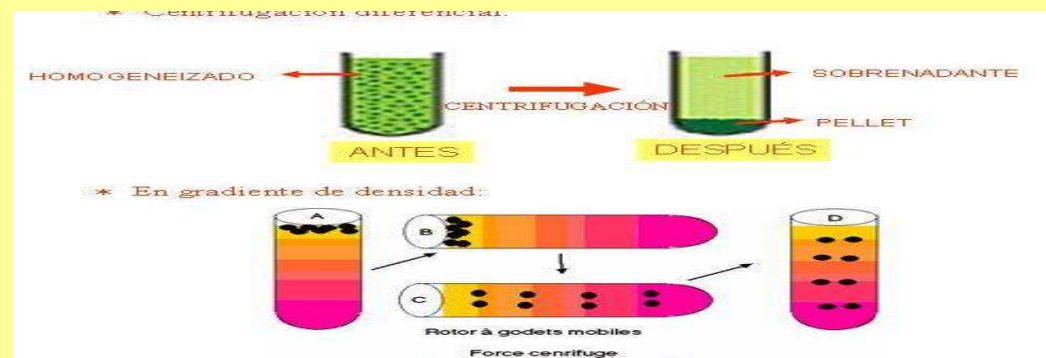
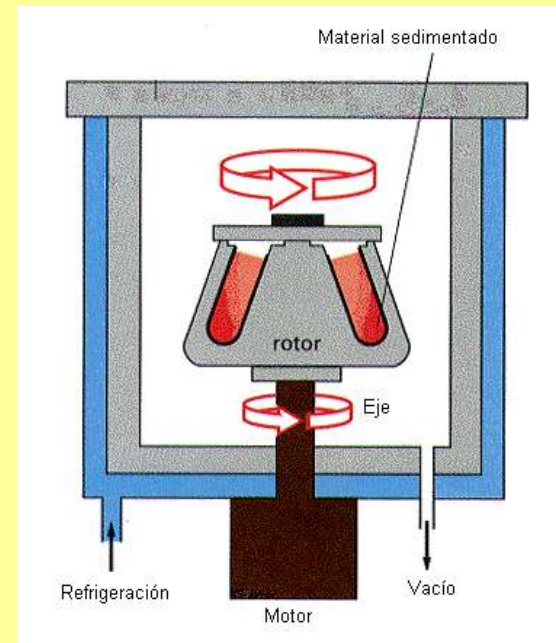
Electroforese II

CENTRIFUGACIÓN

Consiste en someter a unha mezcla homoxeneizada dun tecido a unha elevada velocidade angular, conseguindo as partículas sedimenten en tempos distintos.



Ultracentrífugas: velocidade máxima :
50.000 - 100.000 rpm



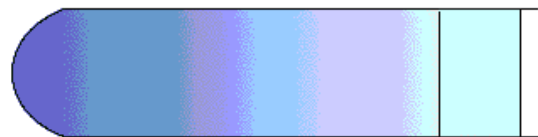
Fraccionamiento subcelular e centrifugación por gradiente



| Fracciones | Contido | g*min |
|------------|--------------------------|------------------|
| N | núcleos | 600*10min |
| M | mitocondrias | 3000*10min |
| L | lisosomas | 25000* 10min |
| P | microsomas e membrana | 100000* 30min |
| S | fracción soluble | |

Separación de
proteínas en
gradiente de
sacarosa

$$s = \frac{v}{c} = \frac{2/9 r^2 (d-d_0)}{\eta}$$



5 to 30% Sucrose gradients Protein sample

Molecules sediment according to
their size, shape and density.



O coeficiente de sedimentación é unha constante característica de cada orgánulo ou macromolécula e as súas unidades danse en *Svedbergs*, tomando o nome do seu descubridor 1 Svedberg (S) = 10^{-13} segundos

Así, "ARN r 18S" identifica á molécula de RNA ribosómico no que o seu coeficiente de sedimentación é de 18 Svedbergs.

Centrifugación

TÉCNICA DE RADIOISÓTOPOS

Certas substancias coñecidas como **trazadores**, poden manifestar a súa presenza e permitir seguir o seu percorrido durante un experimento. Frecuentemente estes trazadores márcanse con isótopos radiactivos (átomos que conteñen unha combinación inestable de neutróns e protóns). A inestabilidade do isótopo radiactivo confire ó átomo unha tendencia a fragmentarse para alcanzar a configuración máis estable.

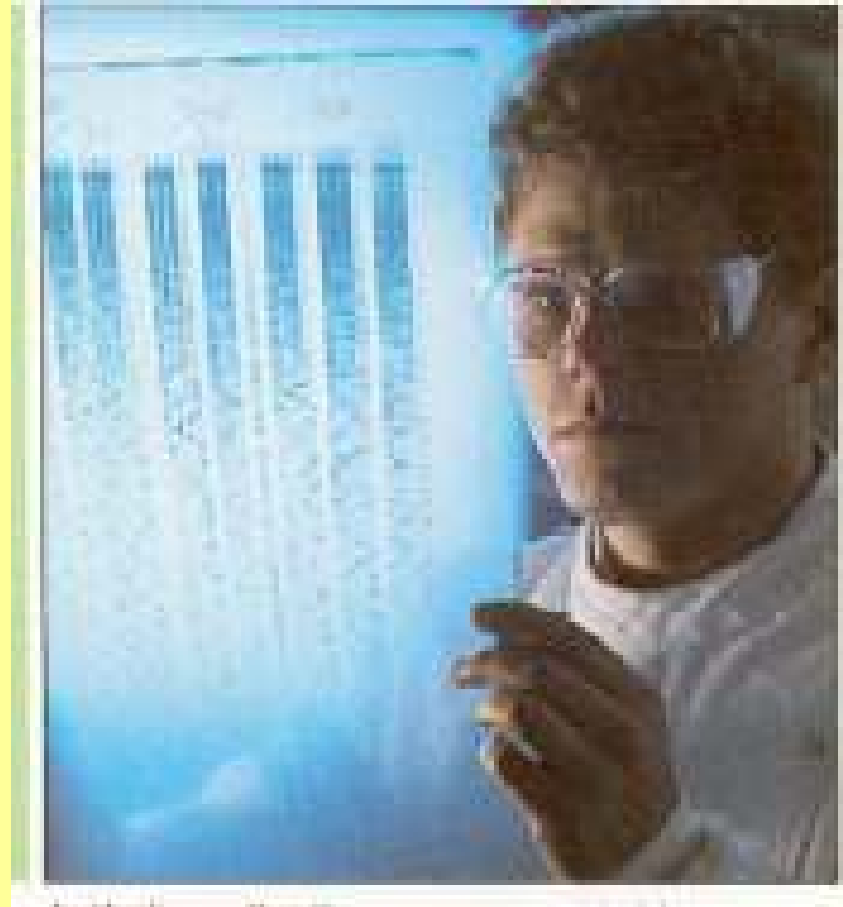
A desintegración dun isótopo radioactivo dá como resultado a liberación de enerxía, contida nalgũa partícula, ou de radiación electromagnética, que poden detectarse por métodos apropiados. Durante a desintegración dos átomos, a radiactividade emitida pode ser de tres tipos: partículas alfa, partículas beta e radiación gamma.

As emisións de partículas pódense detectar mediante dúas técnicas:

A espectrometría de centelleo líquido que se basea na propiedade que teñen certas moléculas, denominadas fosforescentes, para absorber parte da enerxía de unha partícula emitida e liberar enerxía en forma de luz.



Autorradiografía: aproveitase a capacidade que teñen as partículas emitidas por un átomo radiactivo para impresionar una emulsión fotográfica.

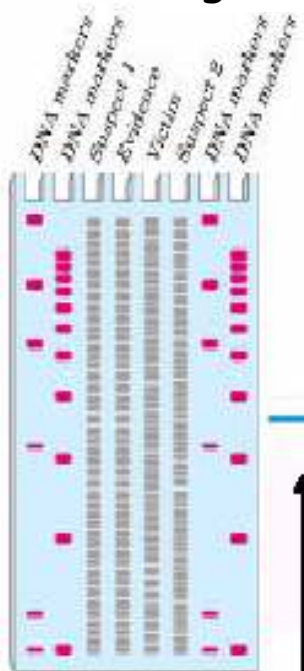


Autorradiografía de ADN

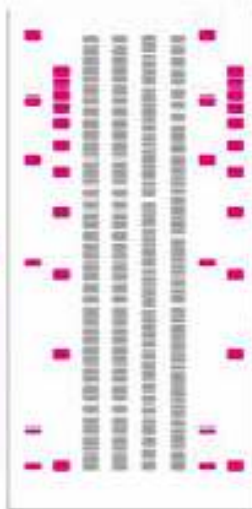


Fragmentos de DNA

Separación dos fragmentos de ADN por electroforesis en xel de agarosa (sen marcar)



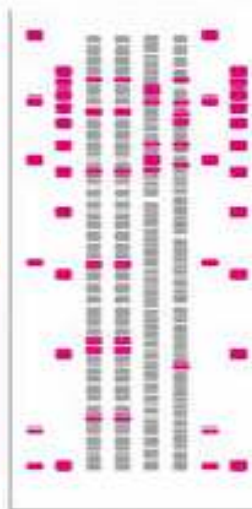
Desnaturalizar o ADN e transferir a papel de nitrocelulosa



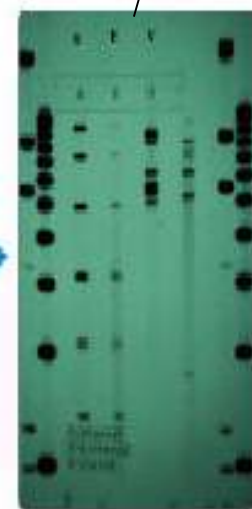
Incubar coa sonda e posterior lavado



Sonda marcada radiactivamente



Expoñer o papel a unha película de raios X



Autorradiografía de ADN



*Departamento Bioloxía e Xeoloxía
I.E.S. Otero Pedrayo. Ourense.*