

CITOLOXÍA

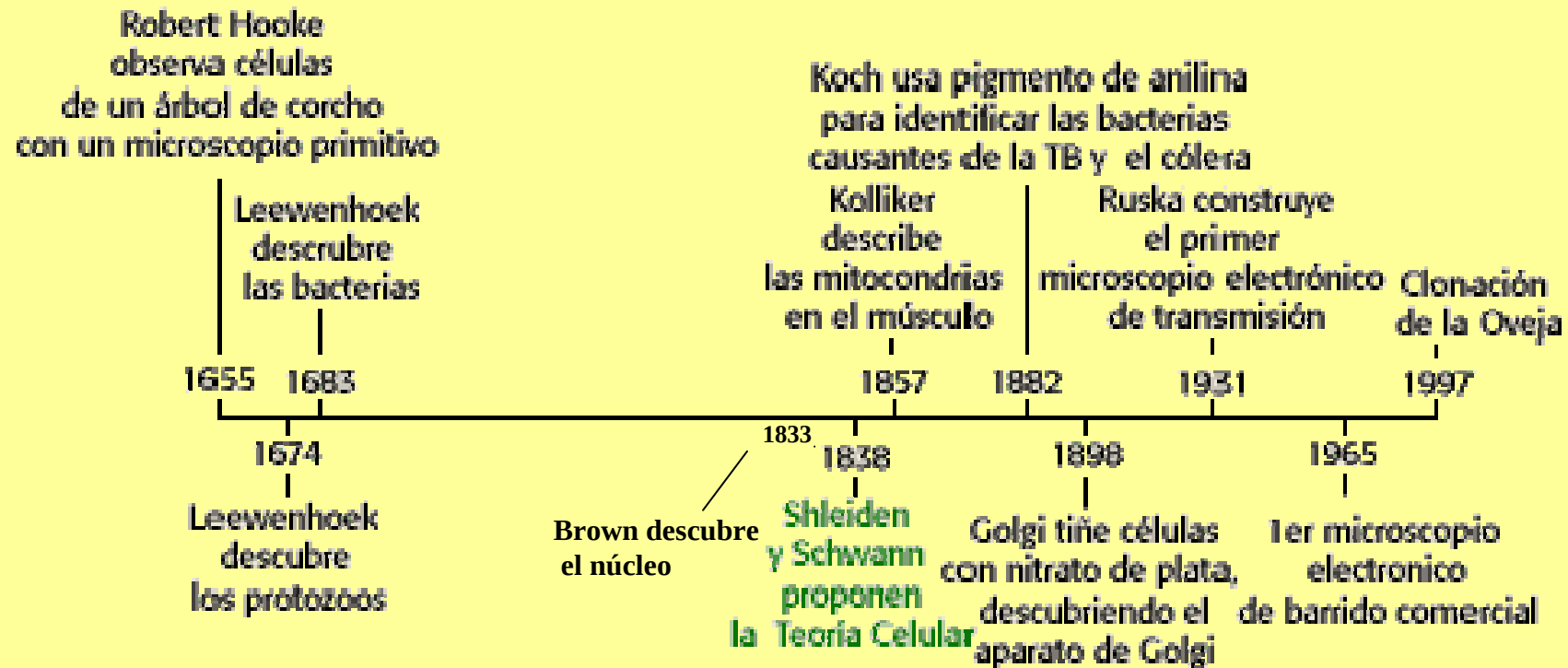
INTRODUCCIÓN Á CÉLULA

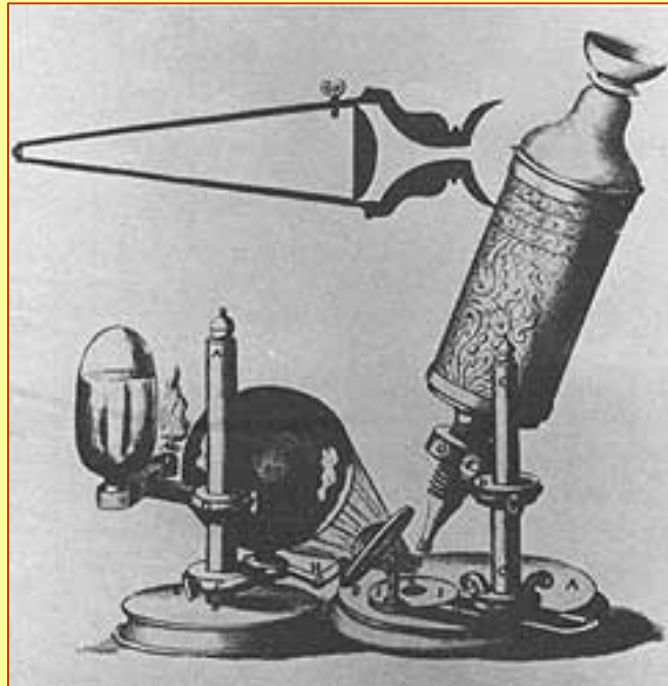


Carmen Cid Manzano

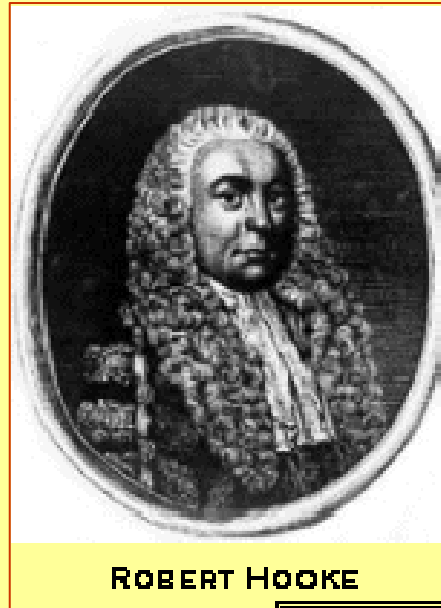
I.E.S. Otero Pedrayo. Ourense. Departamento Bioloxía e Xeoloxía.

MOMENTOS HISTÓRICOS NA BIOLOXÍA CELULAR

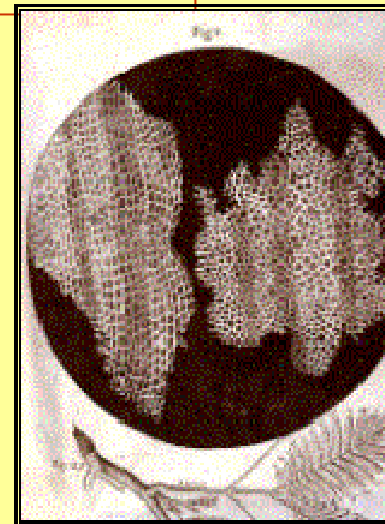




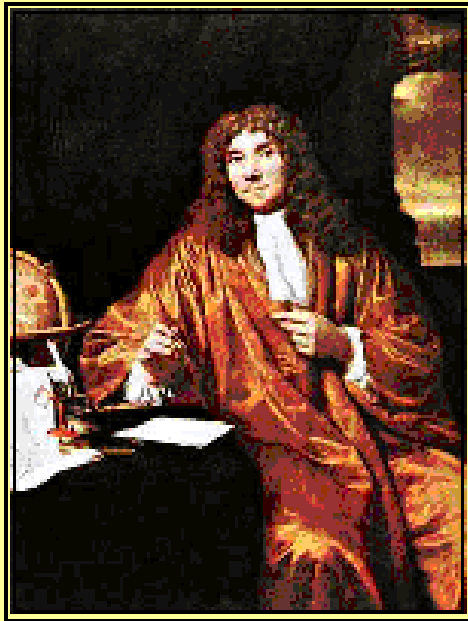
**Microscopio utilizado por
Robert Hooke (1665)**



ROBERT HOOKE

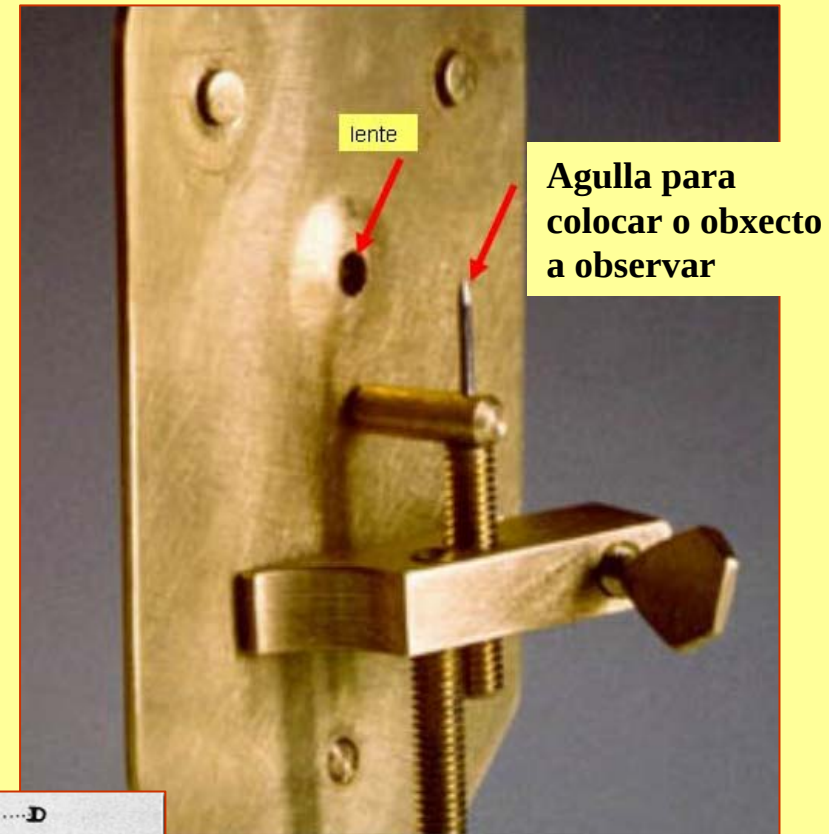
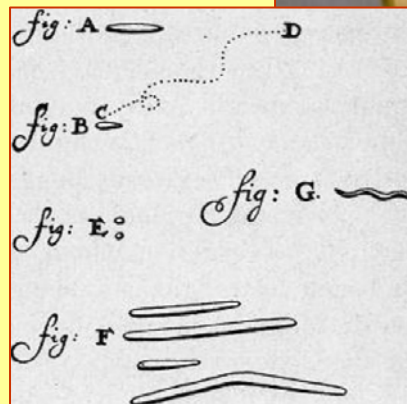


descubre no corcho pequenas
celdiñas ás que chamou células



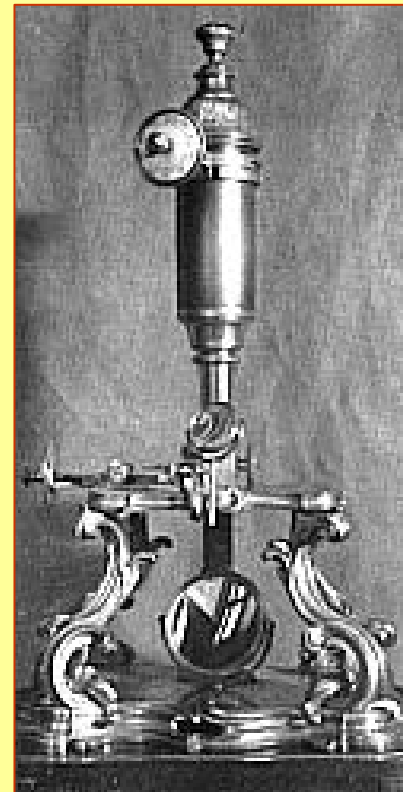
ANTON VAN LEEUWENHOEK

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



Esquemas dos microorganismos obseados 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.



**I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense**



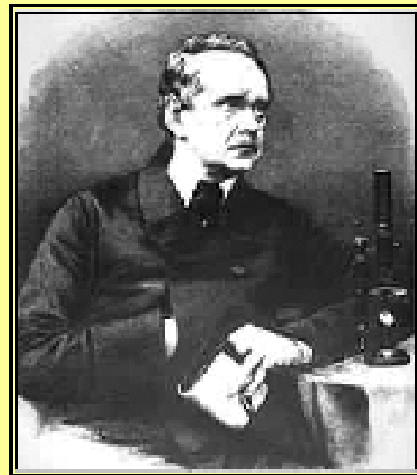
Abbe

Carl Zeiss

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.



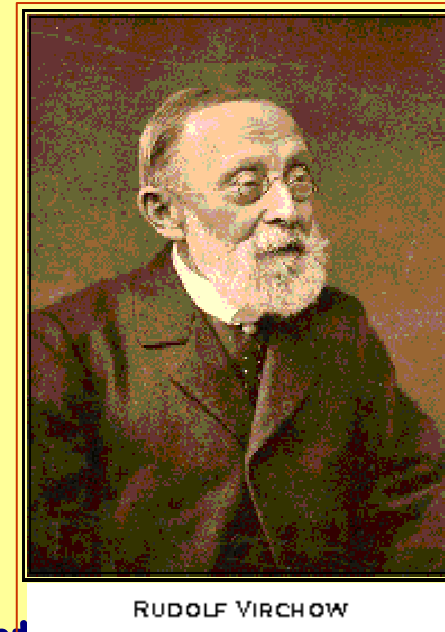
MATTHIAS SCHLEIDEN



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.



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.

http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=4OpBylwH9DU



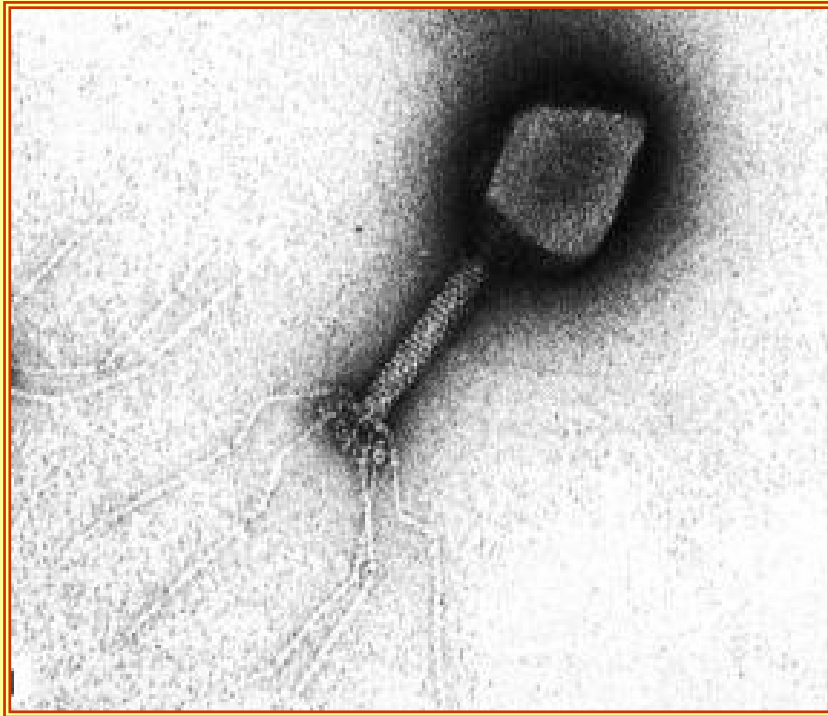
SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Un artista o microscopio

http://centros.edu.xunta.es/iesoteropedrayo.ourense/dptos/bio/ccmc_2009_novo/actividades_alumnado.htm

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



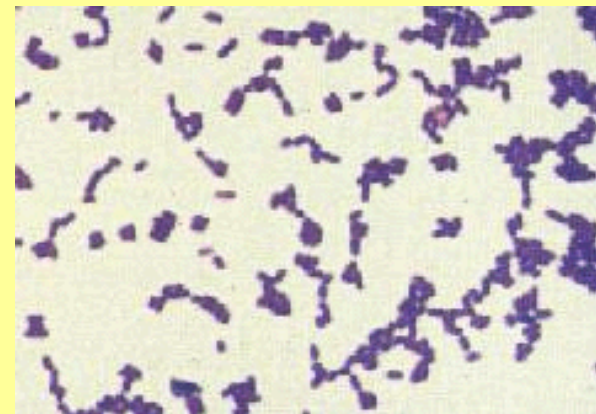
Microscopio óptico



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

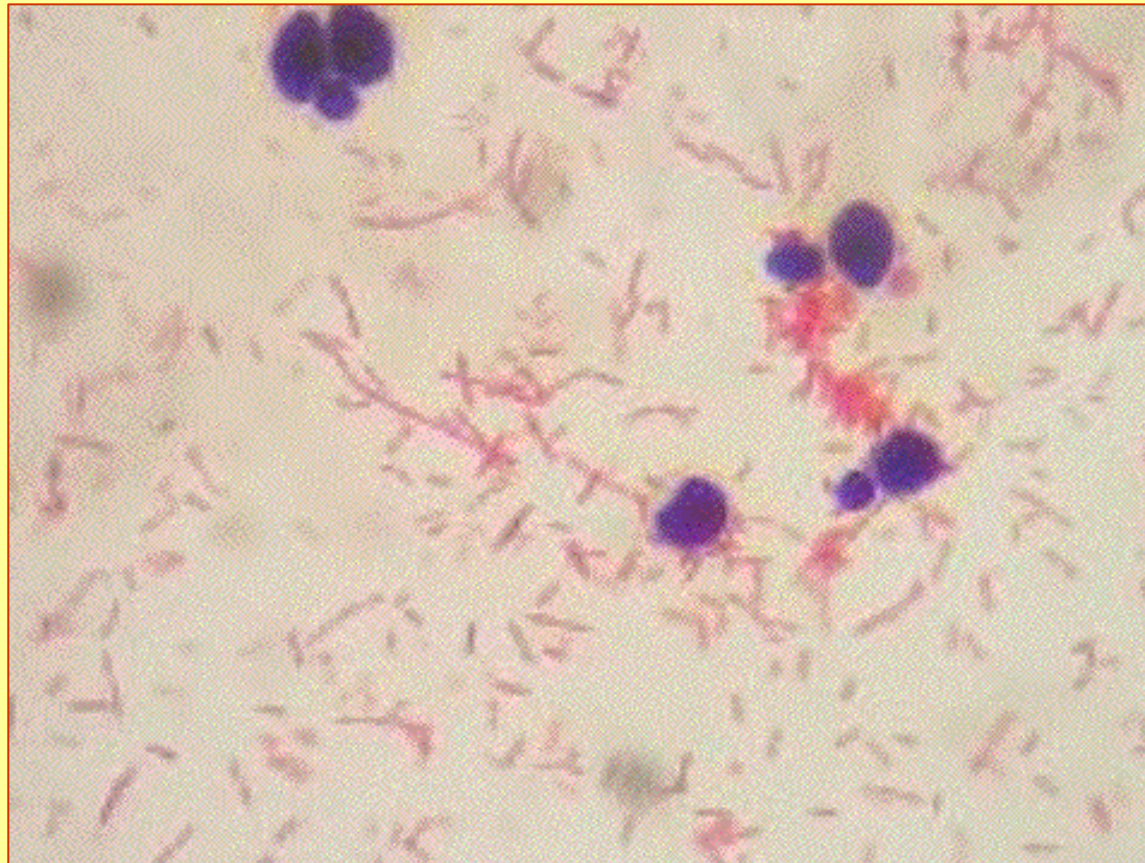
Aínda que o AUMENTO é moi importante, non sempre é suficiente para que apreciemos os detalles dun obxecto. Os outros dous factores que afectan a nosa capacidade para ver unha imaxe de calidade son o CONTRASTE e A RESOLUCIÓN

O CONTRASTE permítenos

- *diferenciar o obxecto do fondo

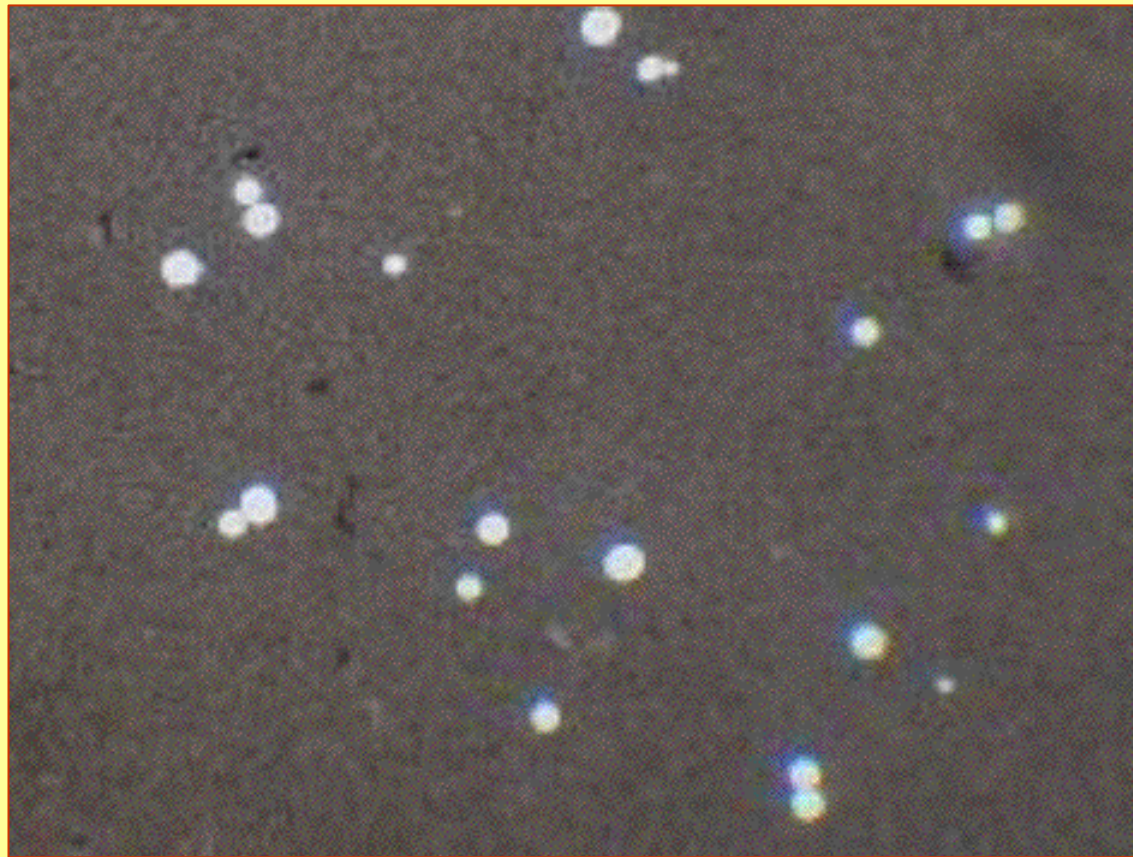
- *apreciar distintas partes do mesmo

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



Microorganismos tinguidos. Microscopio óptico composto. Mestura de bacterias e levaduras

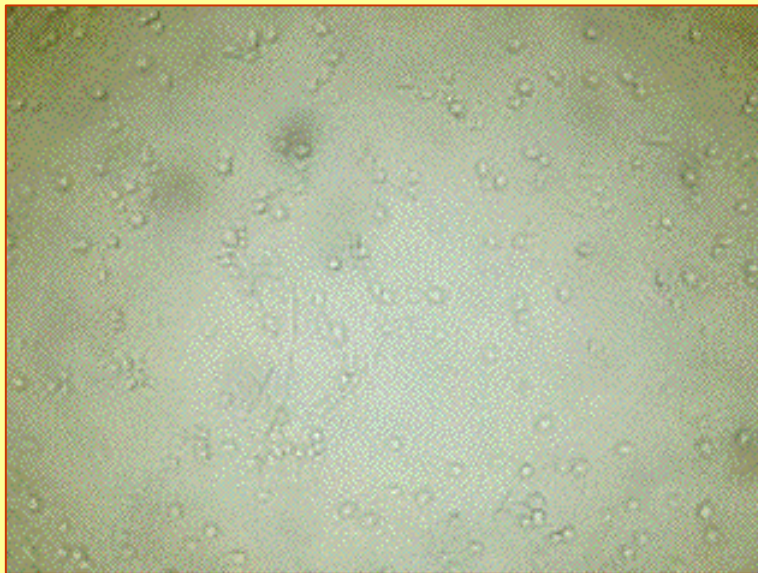
Outra estratexia: Tinción negativa



Microorganismo (Levadura) sen tinguir. Tinguído 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

I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense



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



Algúns tipos de microscópios

Microscopio óptico campo claro

Microscopio óptico campo escuro

Microscopio óptico contraste de fases

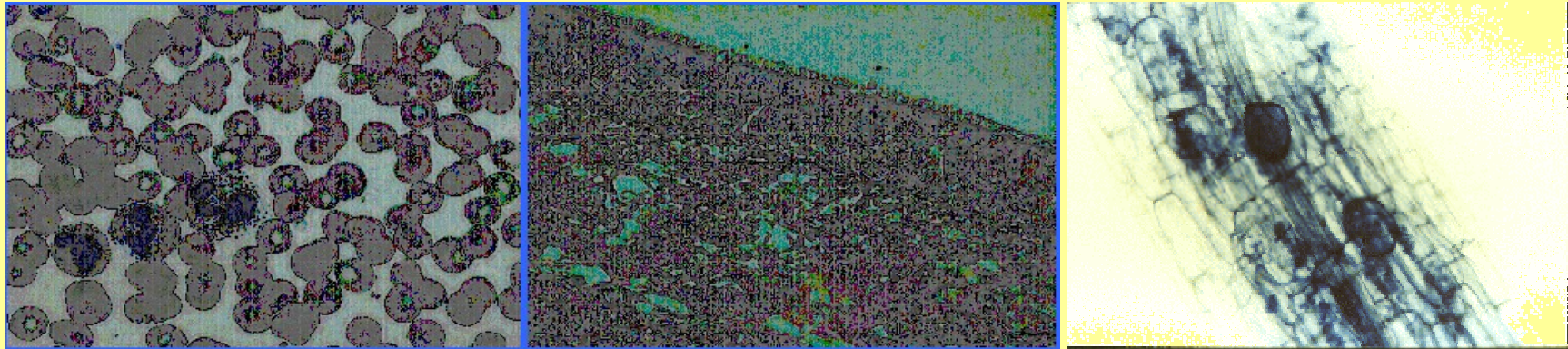
Microscopio de Interferencia (DIC)

Microscopio de fluorescencia

Microscopio electrónico

Microscopio de campo claro

É o microscopio óptico composto utilizado na maioría 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

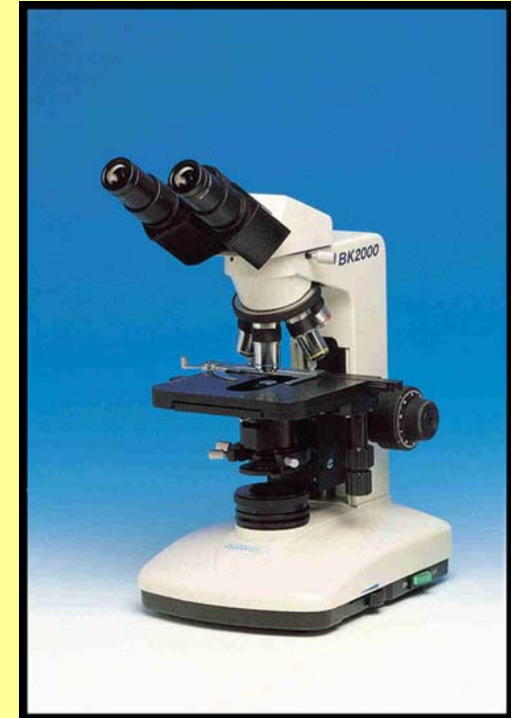
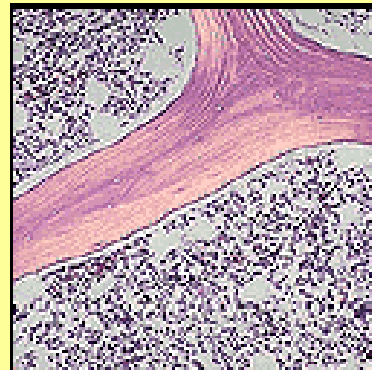
O microscopio óptico

O microscopio óptico ten un límite resolución de cerca de 200 nm ($0.2 \mu\text{m}$, o poder de resolución do olho humano é de $100 \mu\text{m}$). As células observadas baixo o microscopio óptico poden estar vivas ou fixadas e tinguidas.

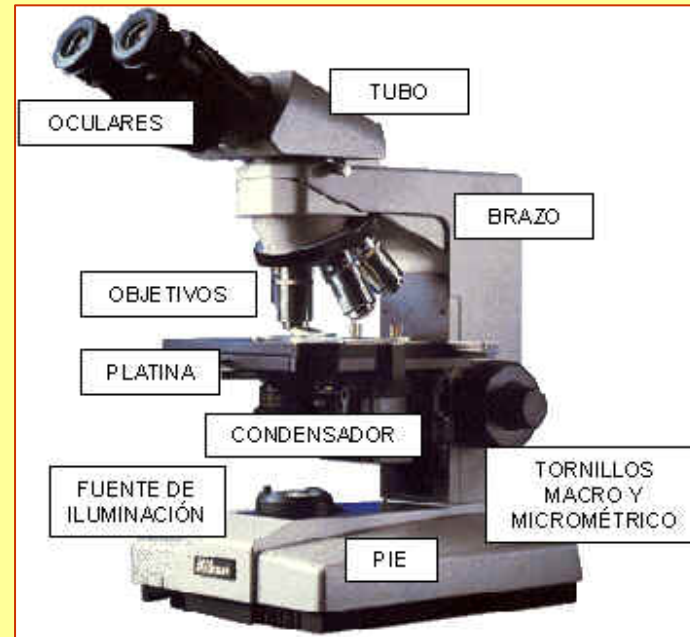
Microscopio óptico



Microfotografía de hueso



O Microscopio Óptico



Sistema óptico

OCULAR: Lente situada cerca do olho 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 consegue 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 oscuro



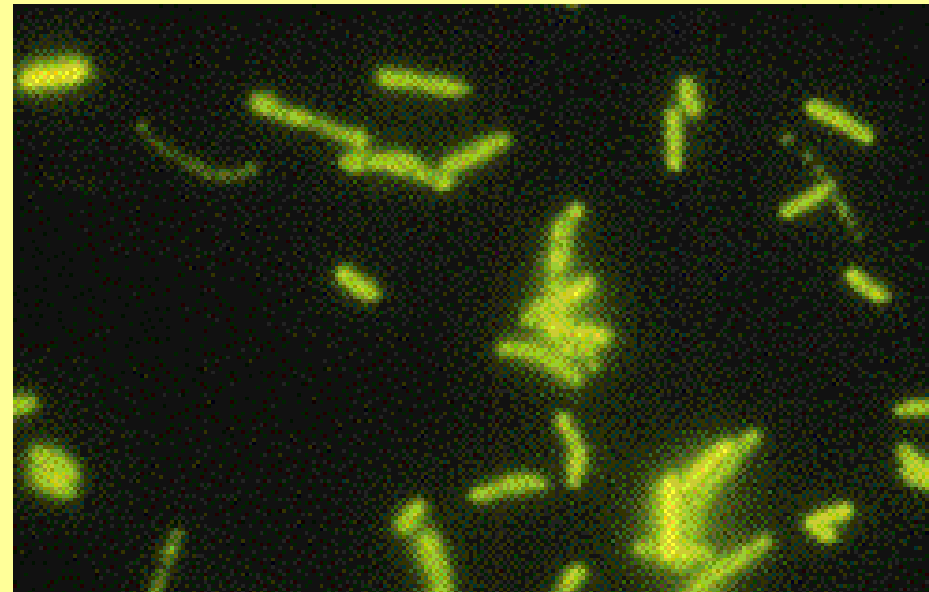
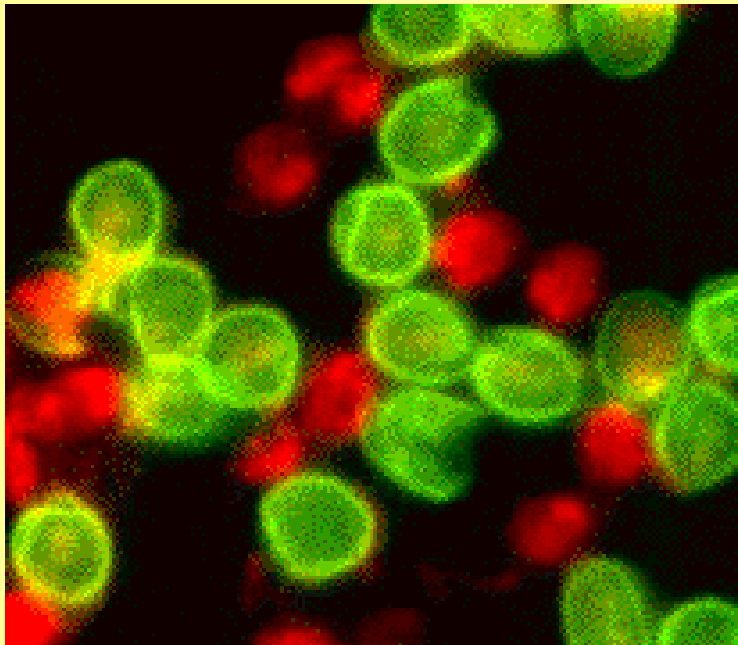
Microscopio de contraste de fases

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.

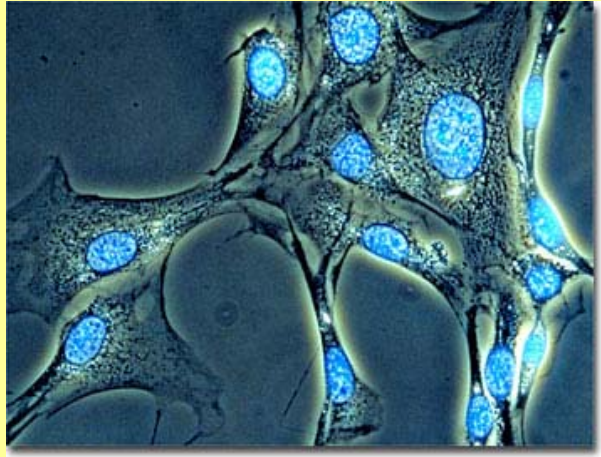
Microscopio de Fluorescencia



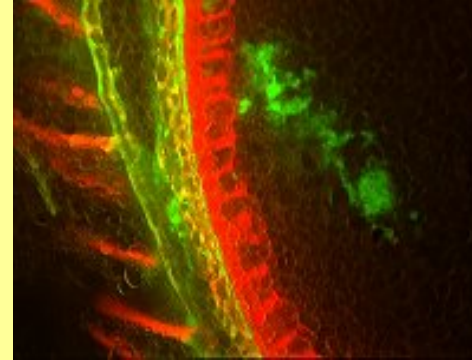
Pódense realizar observacións de estruturas fluorescentes, xa sexan naturais ou artificiais.

Utilízanse colorante fluorescente para marcar moléculas específicas dentro das células. Con este microscopio obsérvanse as moléculas marcadas, brillantes sobre fondo escuro.

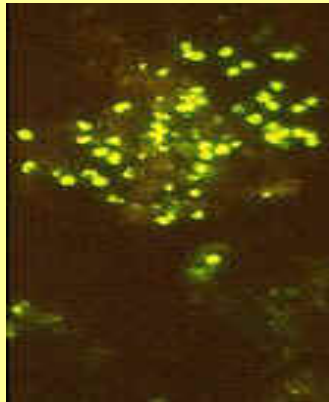
Microscopía de fluorescencia.



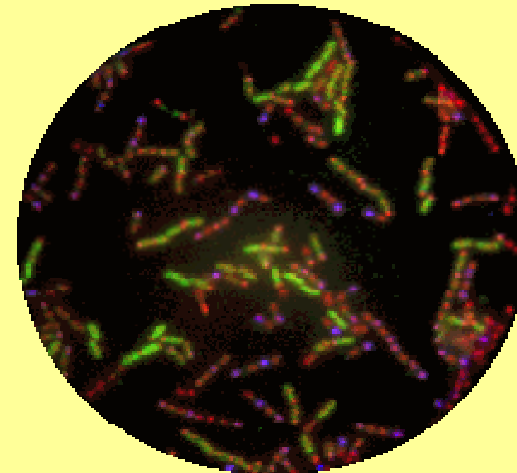
Fibroblastos
tinguidos co
fluorocromo
FITC



Endosperma
sendo
colonizada
por
bacterias



Bacterias en fumarolas mariñas
adheridas a un cristal de sulfuro

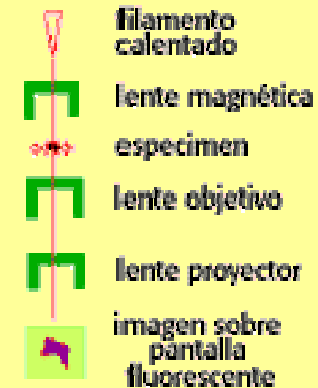


Bacillus subtilis esporulando
tinguidos con FITC, DAPI e
 β galactosidasa.

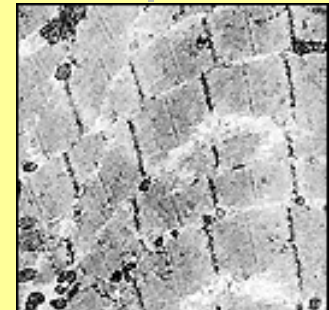


O Microscopio Electrónico de Transmisión(MET)

ME de transmisión

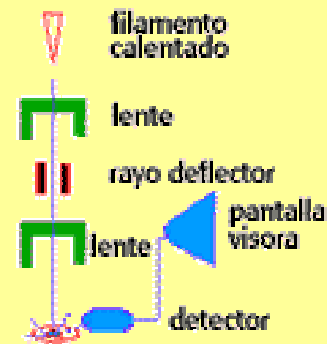


MET en tejido muscular

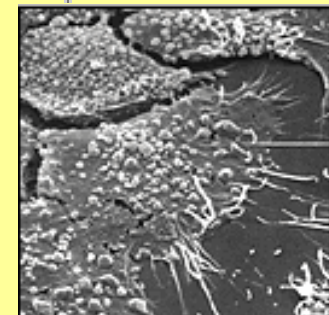


O Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

ME de barrido



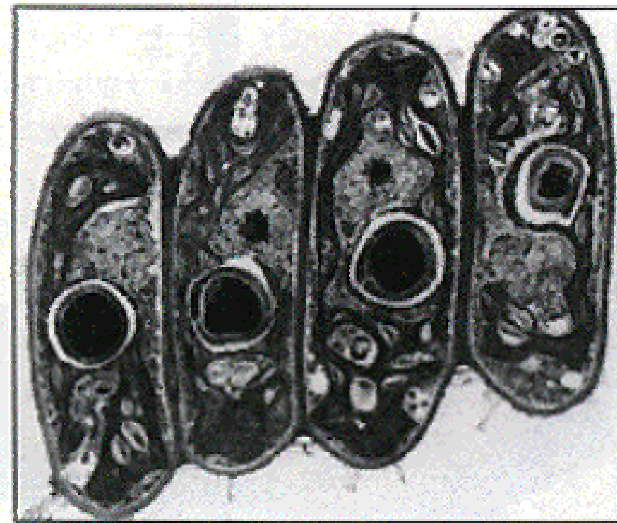
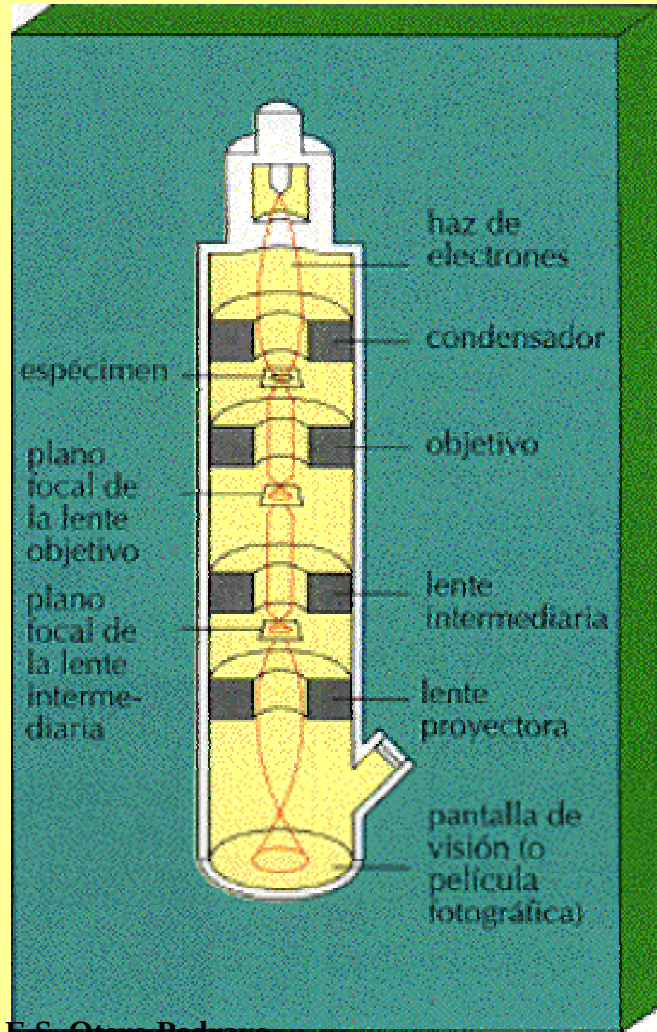
MEB de células hepáticas estresadas



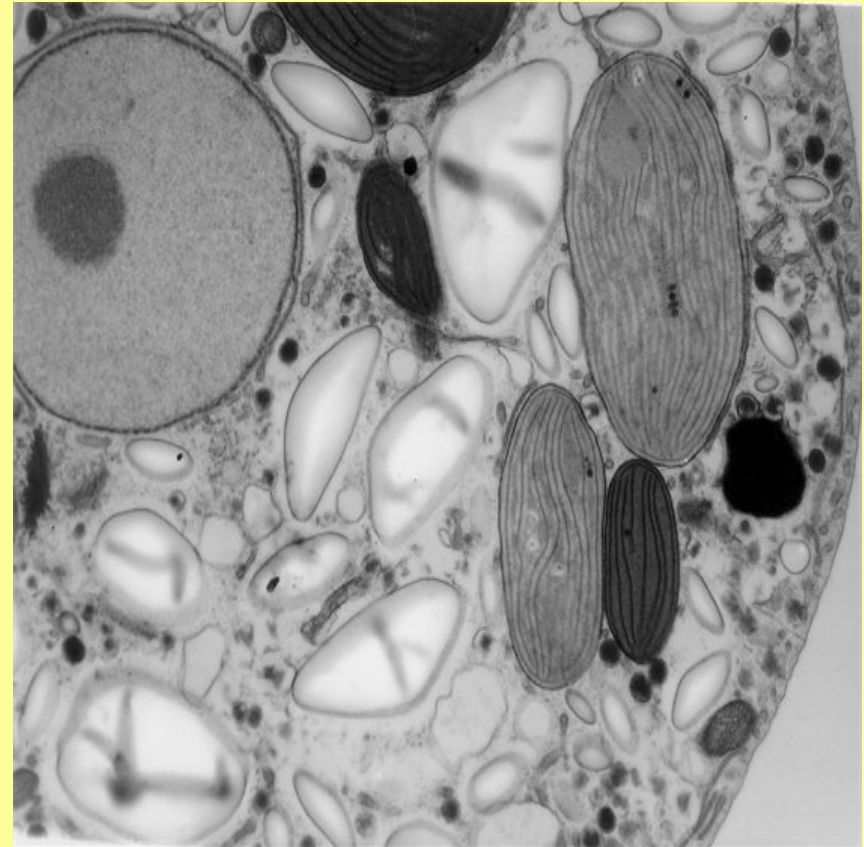
O MET e o MEB ten un límite de resolución de cerca de 2 nm. Obsérvanse células mortas despois de fixadas e tinguidas con ións de metais pesados. Utilízase para observar ultraestructuras celulares chegando ós 100.000 aumentos.

Microscopio Electrónico de Transmisión(MET)

Os e- atravesan a mostra



Microscopia electrónica de transmisión.

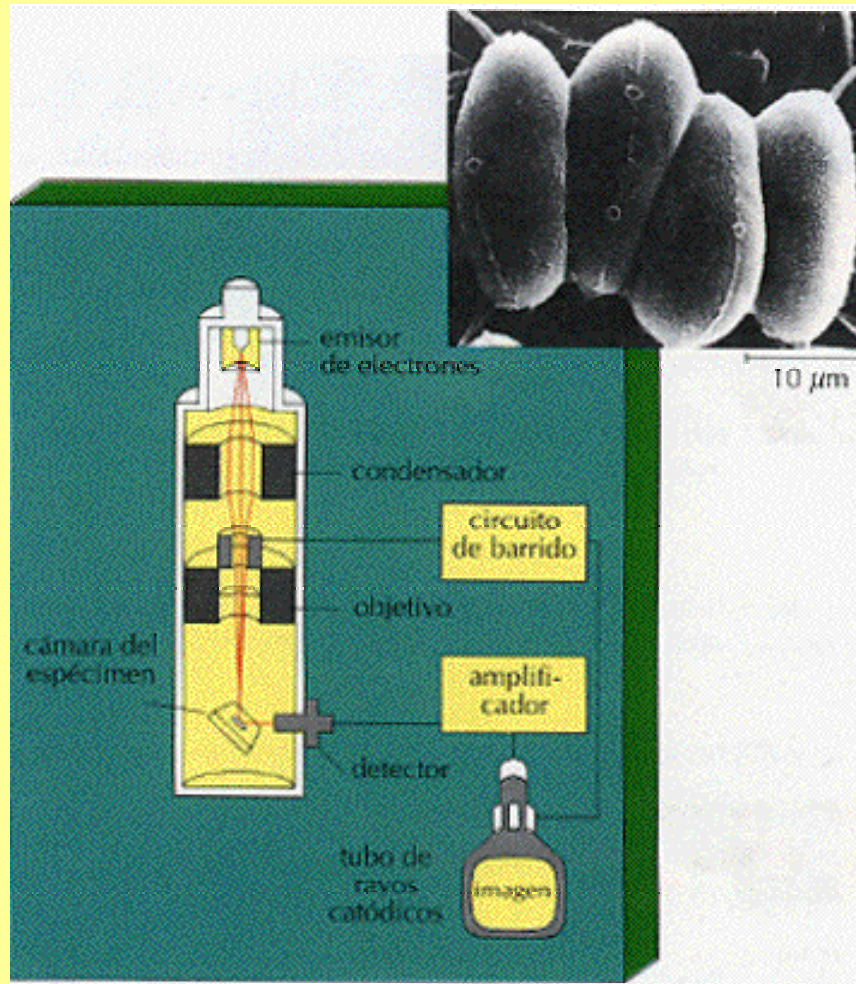


I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense

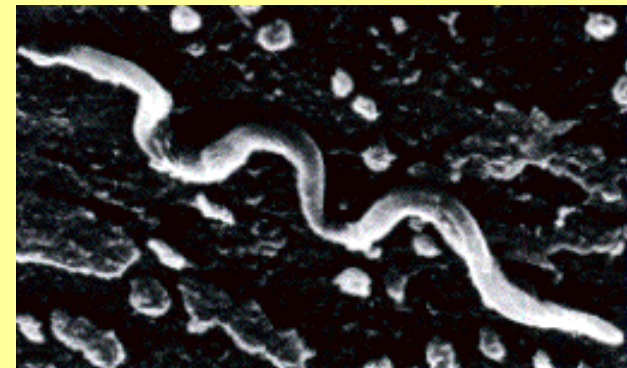
Microscopia dun alga roxa antes
de formar a súa parede

Microscopio electrónico de Barrido (MEB)

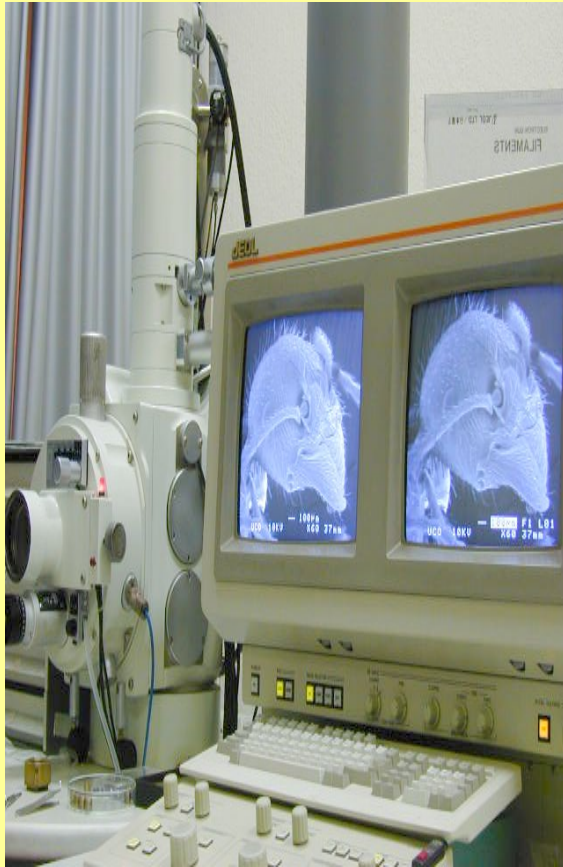
Los e- recorren a mostra



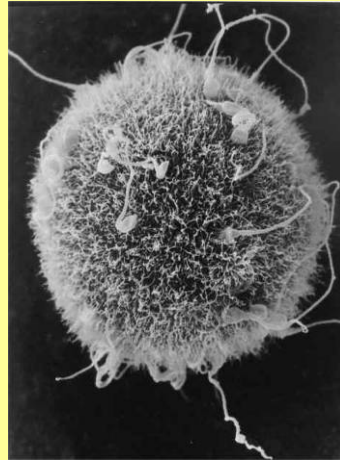
Imaxe en tres
dimensiones



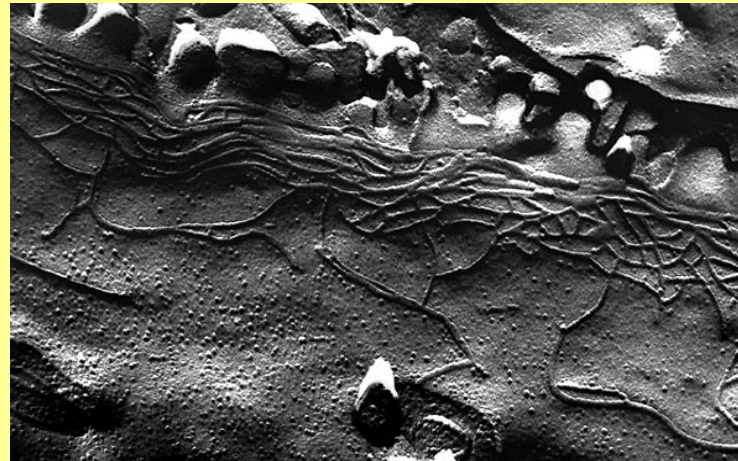
Microscopia electrónica de barrido.



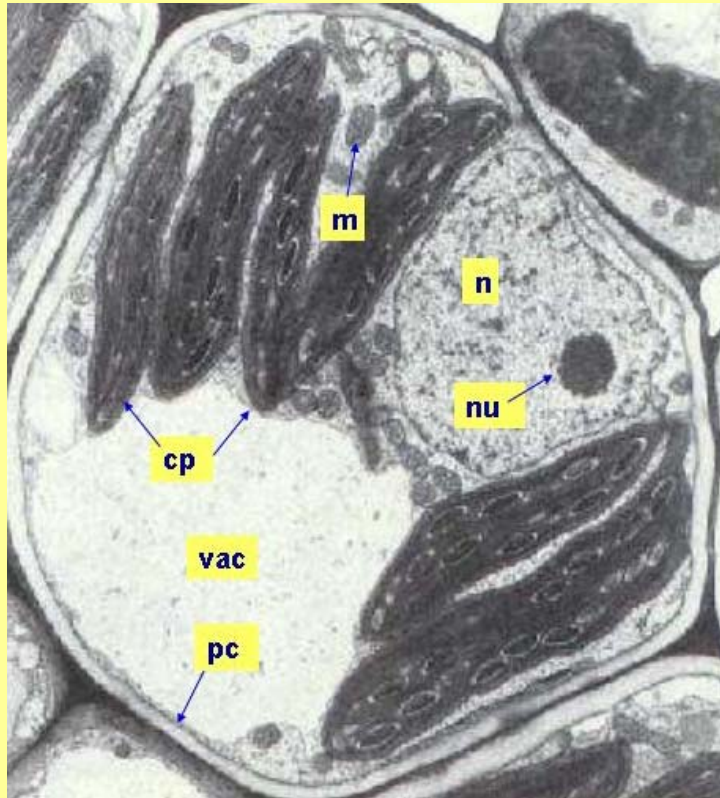
I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense



Óvulo de hamster
sen zona pelucida
con espermatozoides

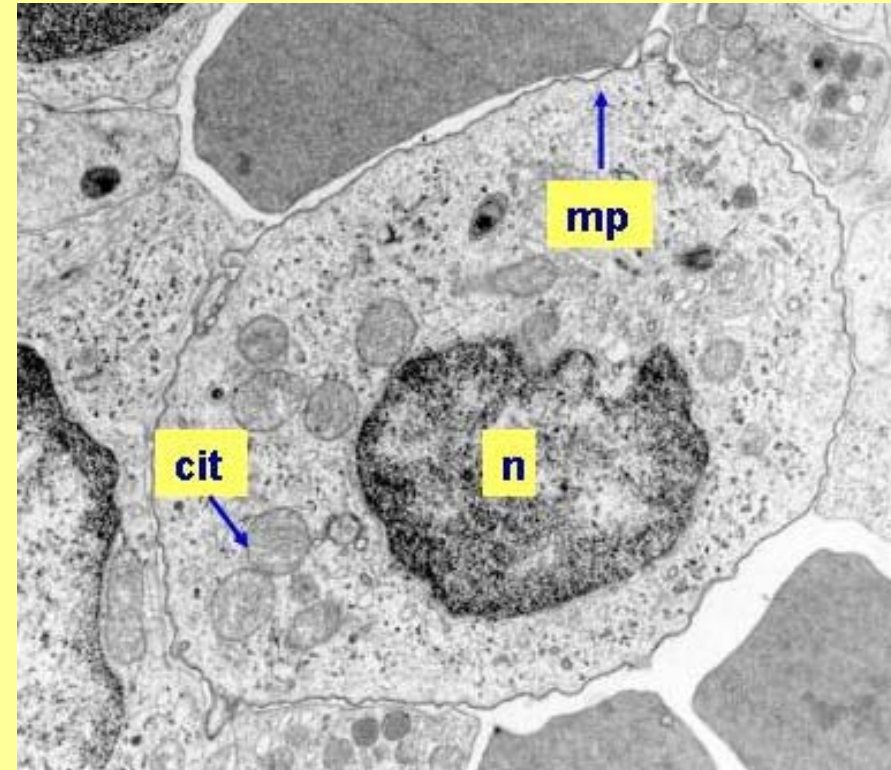


Criofractura de epitelio gástrico vista
polo MEB



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

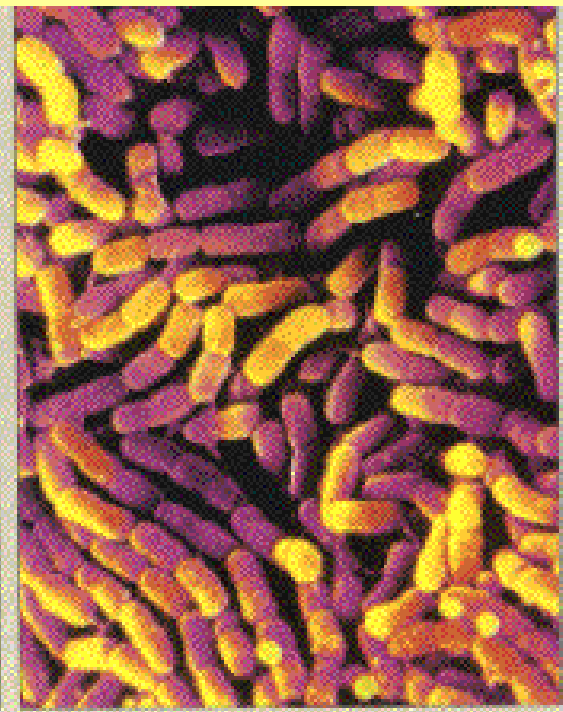
E.coli



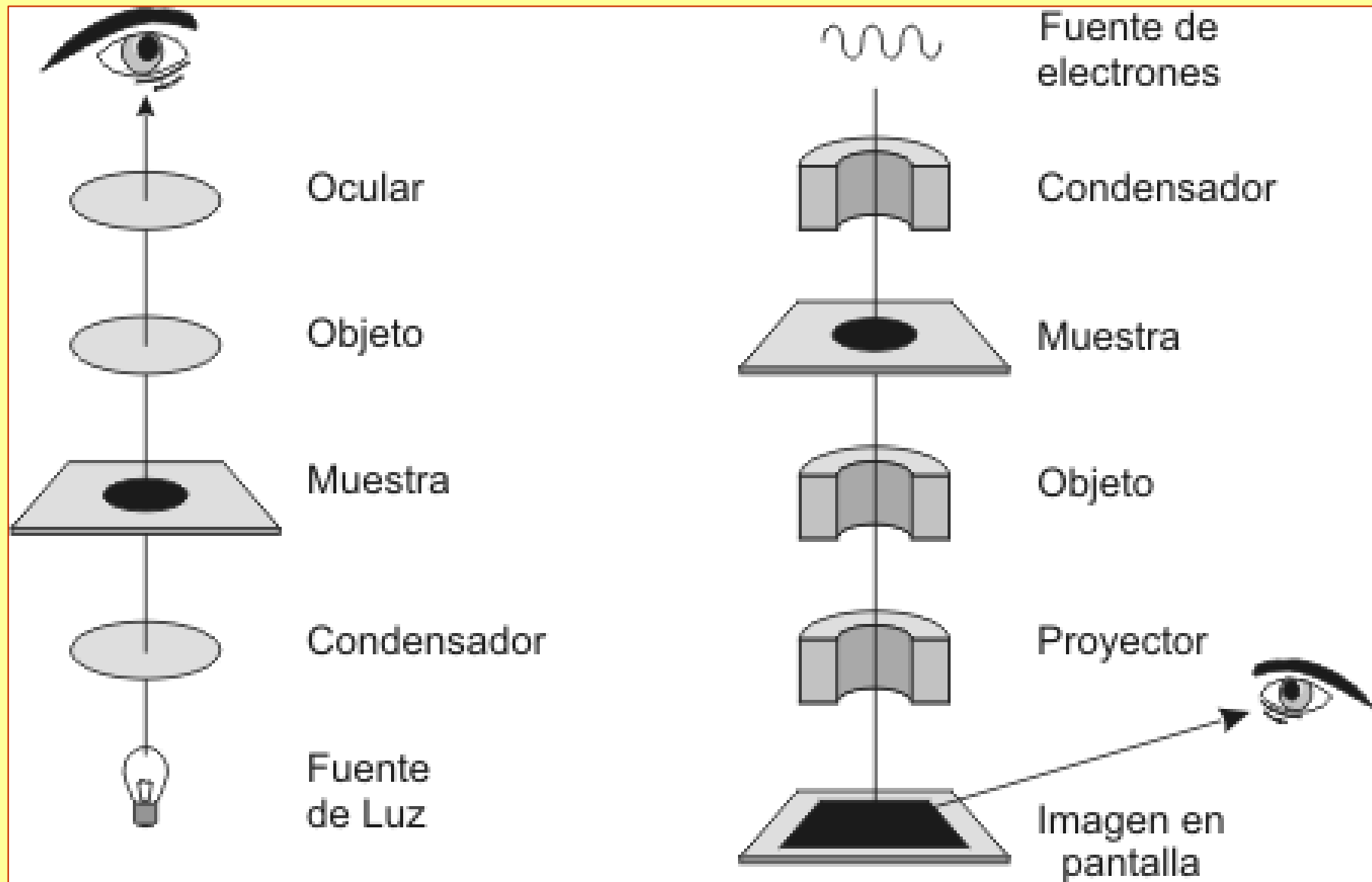
M. óptico



MET



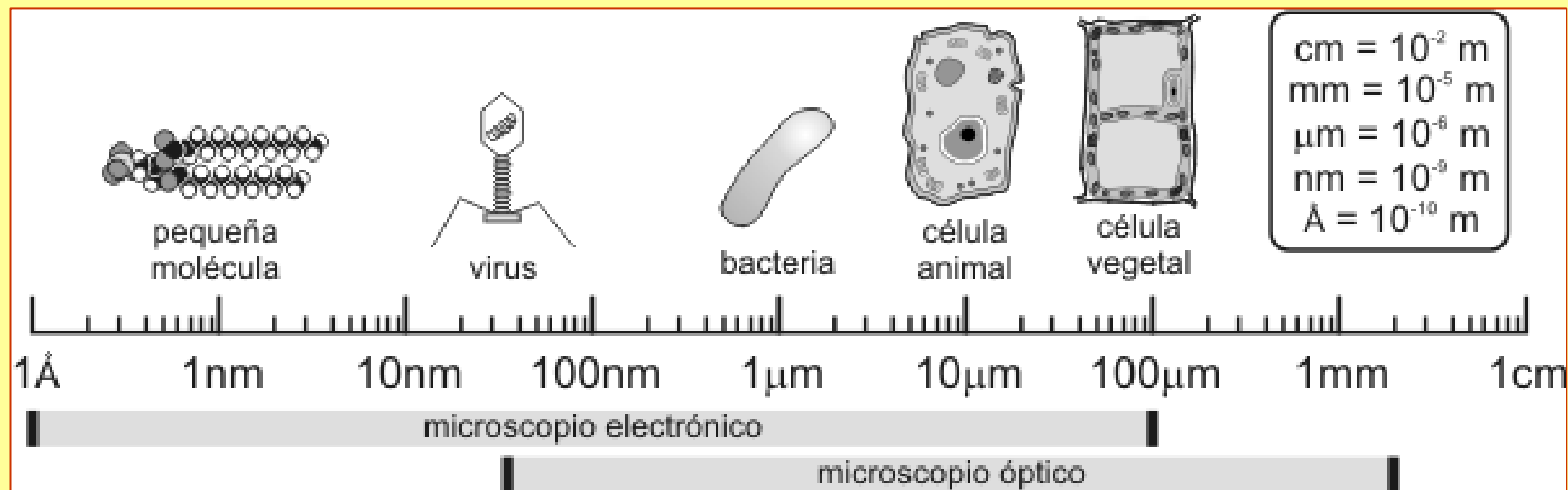
MEB

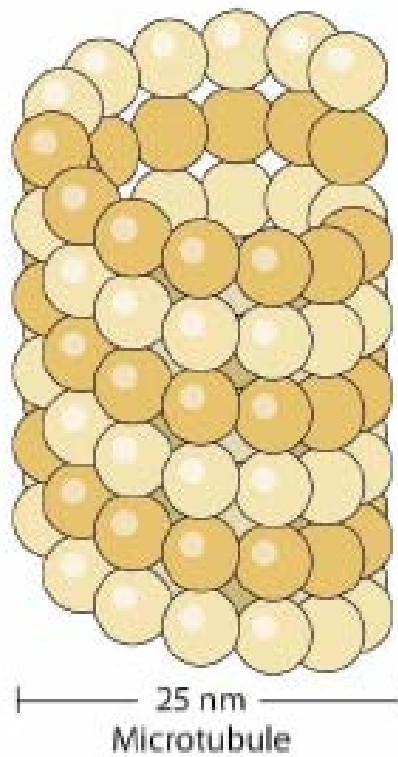
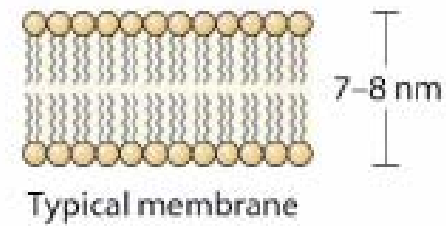
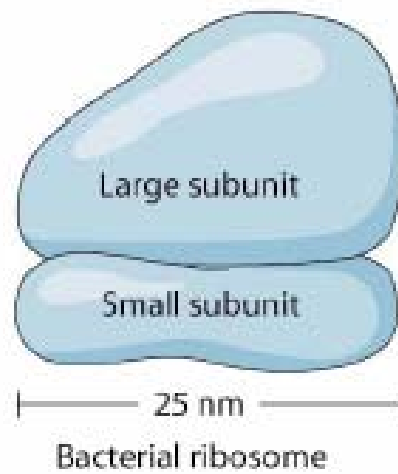


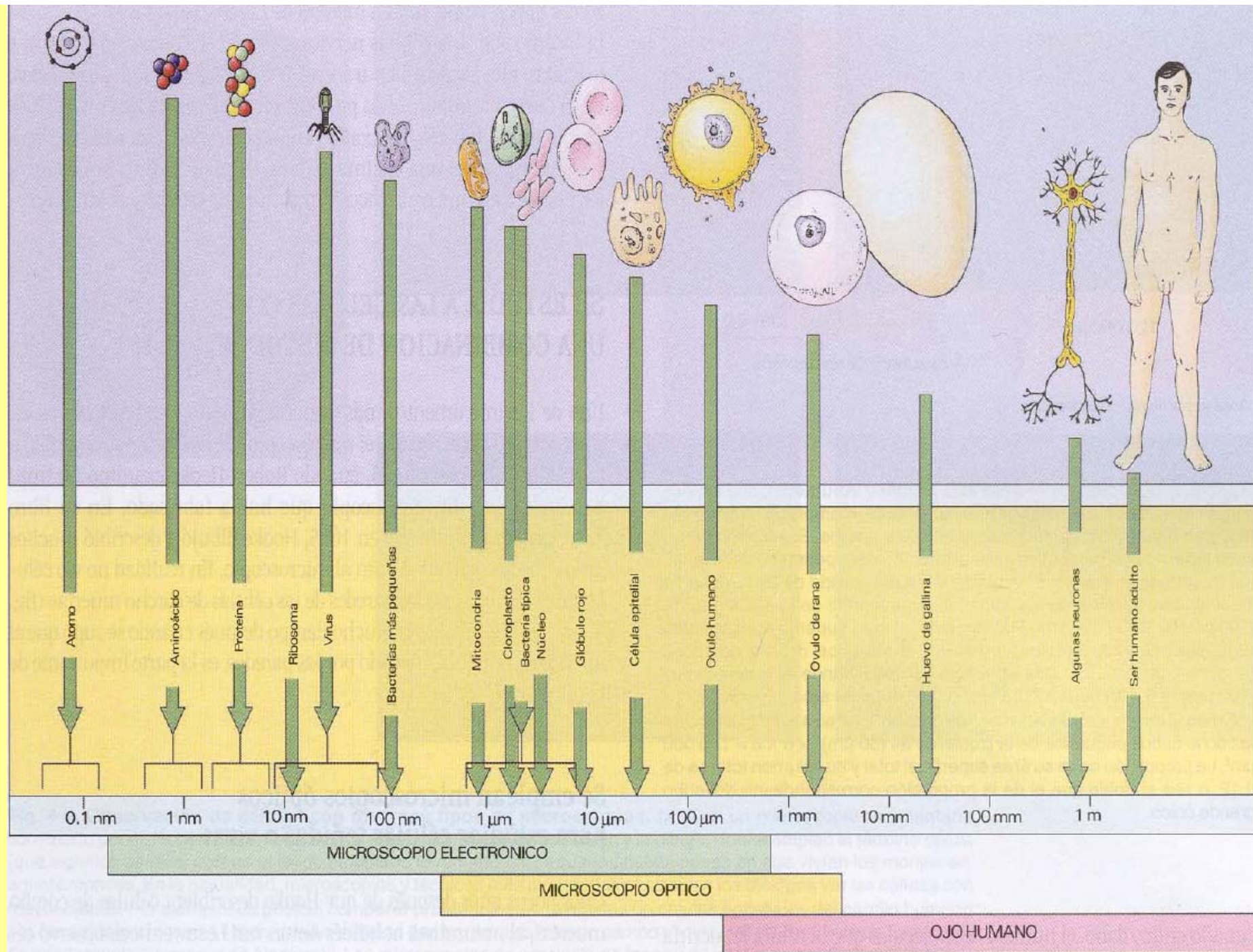
Comparación entre un Microscopio Óptico e Electrónico

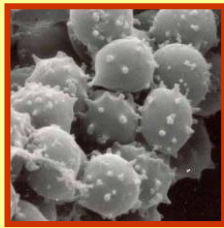
MICROSCOPIO ÓPTICO	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO
Aumentos de ata 2500 veces	Aumentos de ata 500 000 veces
A preparación é atravesada polos raios de luz	A preparación é atravesada polos electróns
As lentes son de cristal	As lentes son campos magnéticos
A imaxe é captada directamente polo ollo	A imaxe é recollida nunha pantalla
As mostras deben ter un grosor medio de 5 a 15 μm	As mostras deben ter un grosor medio de 0,5 μm
Poden observarse células vivas	Non poden observarse células vivas
Permite unha visión de conxunto. On poden observarse moitos dos orgánulos e estruturas subcelulares	Pode observarse a estrutura fina das células
Poden utilizarse colorantes ou observarse a coloración real	A intensa manipulación a que se somete as células fai máis frecuente a aparición de estruturas artificiais (artefactos)

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	Gris en Pantalla fluorescente	Ultraestructuras y Virus
Electrónico Barrido	10.000-100.000	1-10 nm	idem	Tridimensional	idem

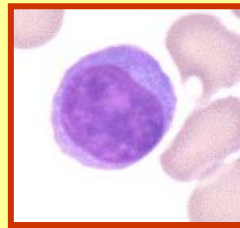




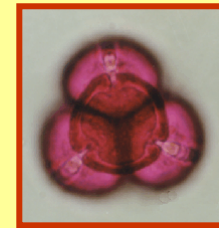




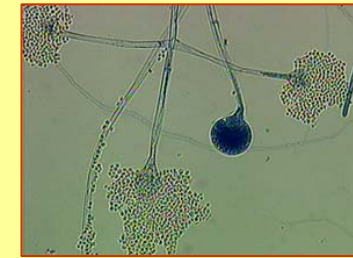
Virus da gripe: non se pode visualizar con microscopio óptico



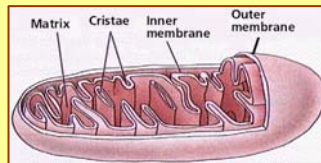
Linfocito: microscopio óptico con obxectivos de x4, x10, x40, x100



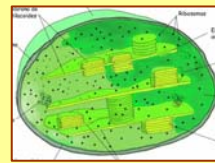
Gran de pole: a partir de 10x



Moho do pan pódese ver a partir de 4x



Mitocondria: con obxectivo de 100x



A grana cloroplasto: non se podería ver co microscopio óptico



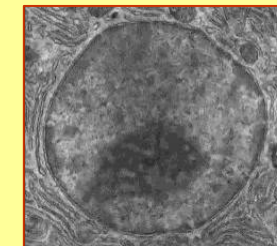
Cromosoma: poderíase ver con obxectivo a partir de 40x



Bacteria intestinal: a partir do obxectivo de 40x



Ribosoma: non se pode observar co microscopio óptico



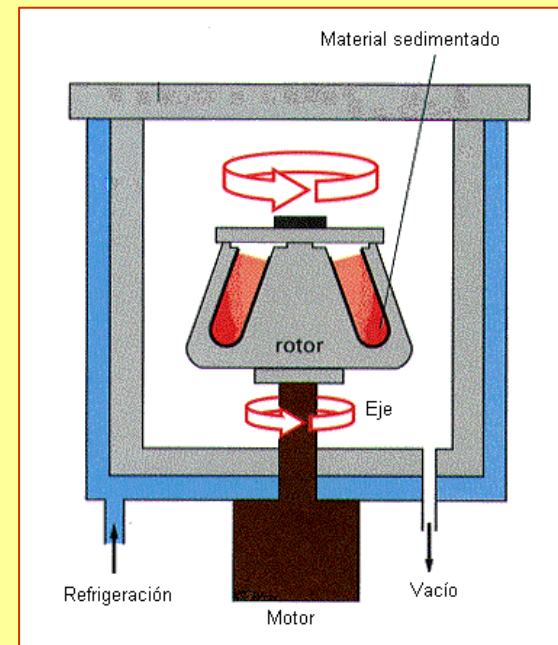
Núcleo: a partir de 10x

CENTRIFUGACIÓN

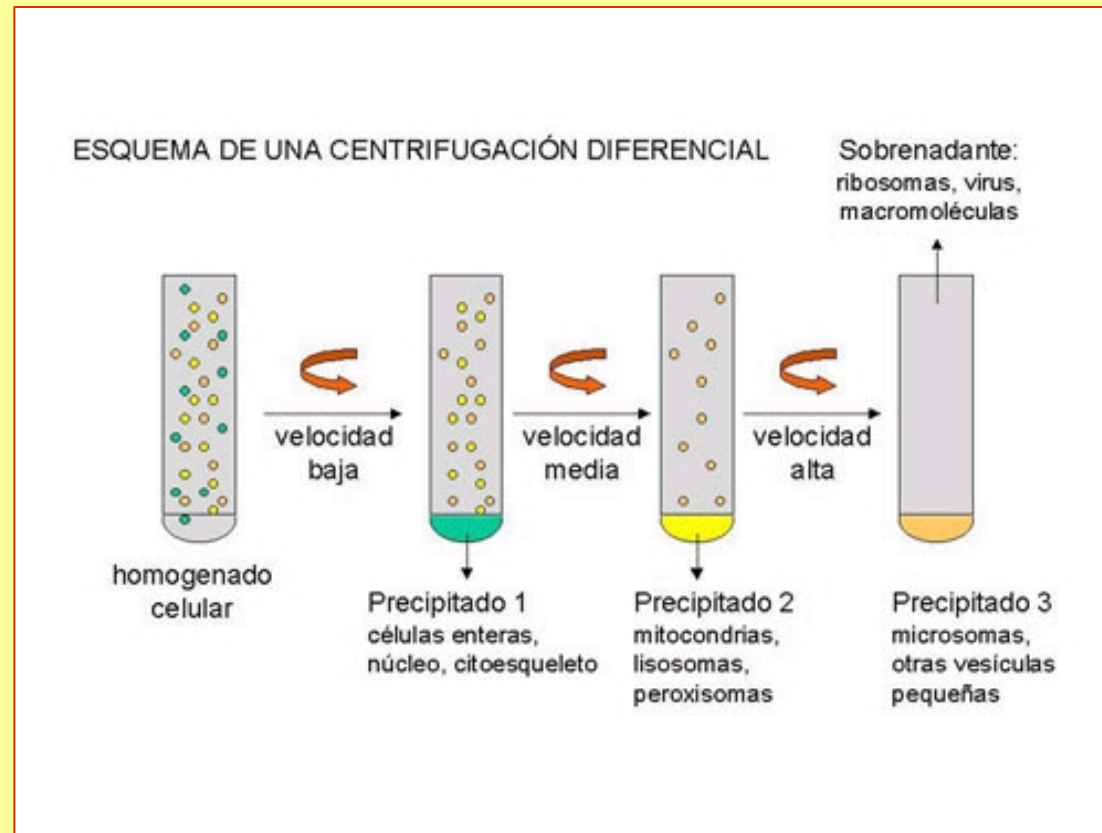
Consiste en someter a unha mezcla homoxeneizada dun tecido a unha elevada velocidade angular, conseguindo as partículas sedimenten en tempos distintos.



Ultracentrífugas: velocidade máxima :
50.000 - 100.000 rpm



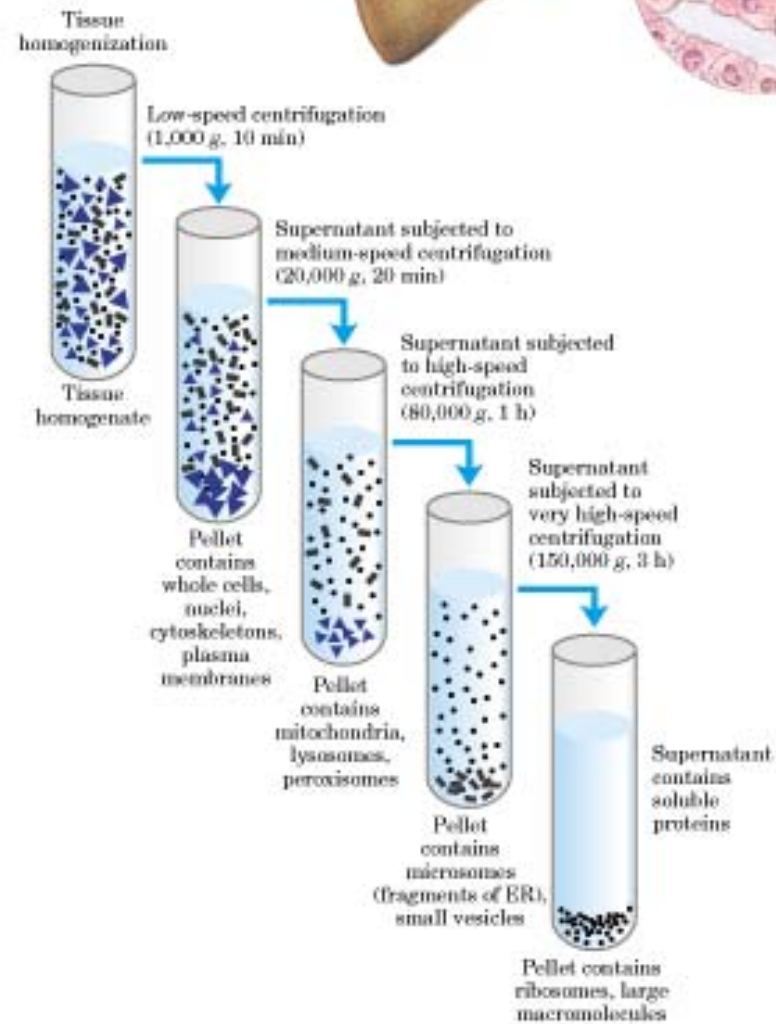
Existen varios tipos de centrifugación, no esquema da dereita atópase a **centrifugación diferencial**



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.

(a) Differential centrifugation



Nobel para la proteína 'chivata'

Un japonés y dos estadounidenses reciben el galardón de Química

ALICIA RIVERA
Madrid

Un bioquímico japonés y dos estadounidenses recibieron ayer el máximo reconocimiento que un científico puede esperar: el Premio Nobel, en el área de Química, por sus sucesivos descubrimientos que sirvieron para convertir una medusa en una herramienta fundamental para ver qué pasa dentro de una célula, para ver cómo funciona una maquinaria que puede medir 0,02 milímetros y que, si se estropea, produce enfermedades en el organismo.

Osamu Shimomura (de 80 años), Martin Chalfie (de 61 años) y Roger Y. Tsien (de 56 años) reciben el galardón por una proteína que se une por ingeniería genética a otra que sería invisible de otro modo, la marca y se *chiva* —iluminándose de verde fluorescente— acerca de los movimientos, posiciones o interacciones de la proteína etiquetada.

La historia de este descubrimiento empieza con una medusa de las aguas costeras norteamericanas, con esa proteína suya que brilla en verde cuando se ilumina con luz ultravioleta. Pero el reparto de aportaciones de los tres galardonados (en este ca-



Los galardonados con el Nobel de Química: Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Tsien. / EFE / AP

so se dividen a partes iguales el millón de euros de dotación del Nobel), es claro, casi como en los cuentos. Uno (Shimomura) descubrió, en 1962, la bioluminiscencia de la proteína de la medusa; otro (Chalfie) se dio cuenta, 30 años después, de que podía utilizarla, y la usó como marcador para delatar lo que había dentro de una célula; el tercero (Tsien) desarrolló después toda una paleta de proteínas de colores que se ha convertido en herramienta de gran utilidad pa-

raver procesos celulares de otro modo invisibles.

Las biociencias ganaron así un nuevo microscopio para estudiar, por ejemplo, cómo crece un tumor, el desarrollo del Alzheimer en las neuronas del cerebro o el crecimiento patológico de una bacteria, resaltó ayer el Comité Nobel. La proteína, denominada GFP, es verdosa a la luz del sol, amarillenta a la luz de una bombilla y verde fluorescente con luz ultravioleta, y no necesita ningún aditivo para res-

plandecer, por lo que no se altera con ella esa delicada maquinaria que se quiere ver en funcionamiento.

Miles de investigaciones se hacen actualmente en el mundo con este peculiar microscopio, desarrollado a partir de la naturaleza de la medusa. Por cierto, destacó ayer el Comité Nobel de la Real Academia de Ciencias sueca, sigue siendo un misterio por qué la evolución hizo que brille así la medusa *Aequorea victoria* de Shimomura.

EL PAÍS, jueves 9 de octubre de 2008

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 nalgunha 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.

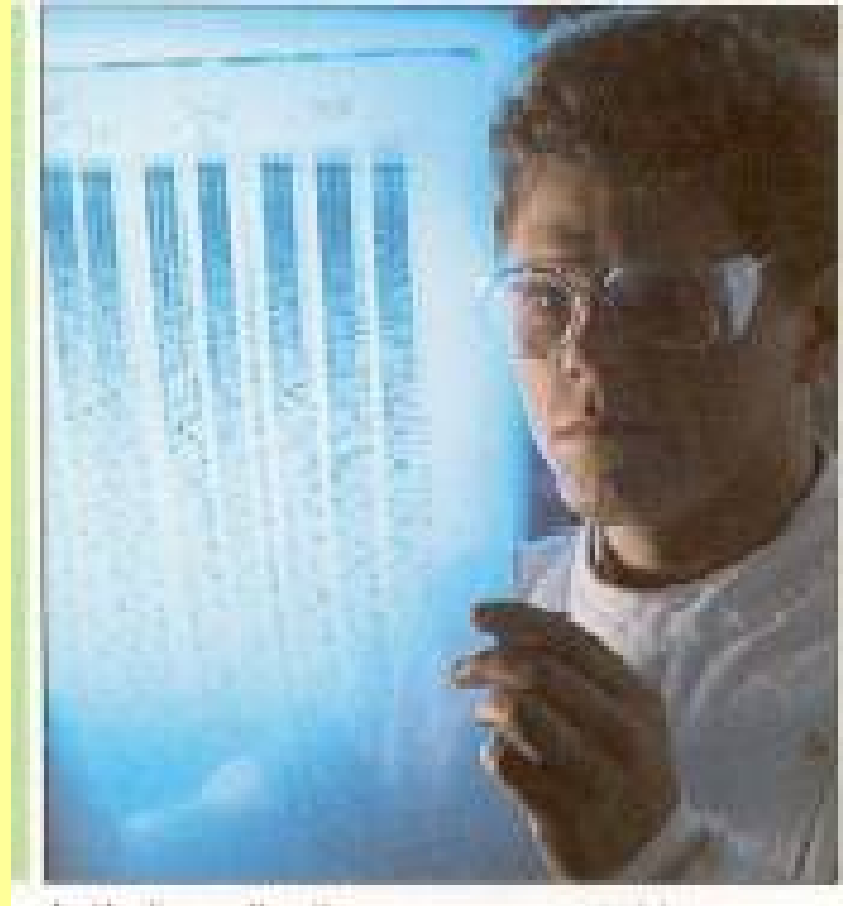
As emisións de partículas pódense detectar mediante dúas técnicas:

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.



Tinción con bromuro de etidio
que emite fluorescencia cuando
se ilumina con luz ultravioleta

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

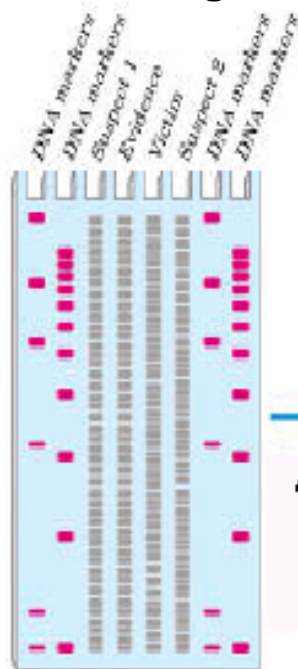


Autorradiografía de ADN



Fragmentos de DNA

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



^{32}P

Sonda marcada radiactivamente

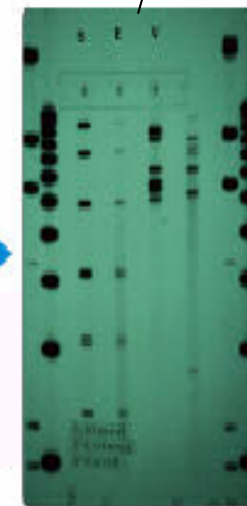


Desnaturalizar o ADN e transferir a papel de nitrocelulosa

Incubar coa sonda e posterior lavado

Expoñer o papel a unha película de raios X

Autorradiografía de ADN



MÉTODOS MÁIS FRECUENTES DE ESTUDIO DOS CONSTITUINTES CELULARES

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

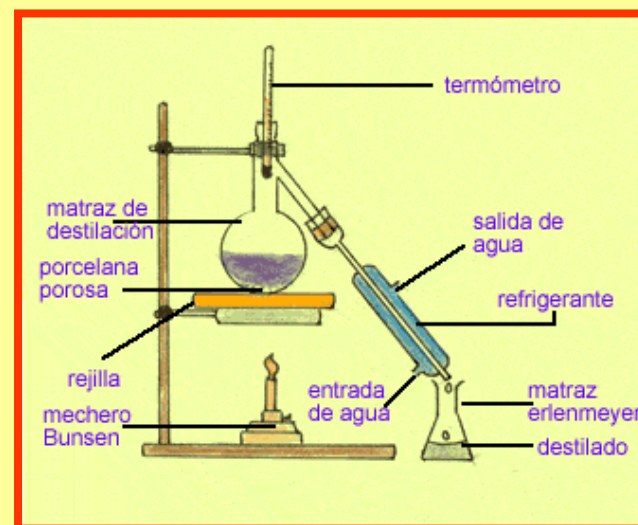
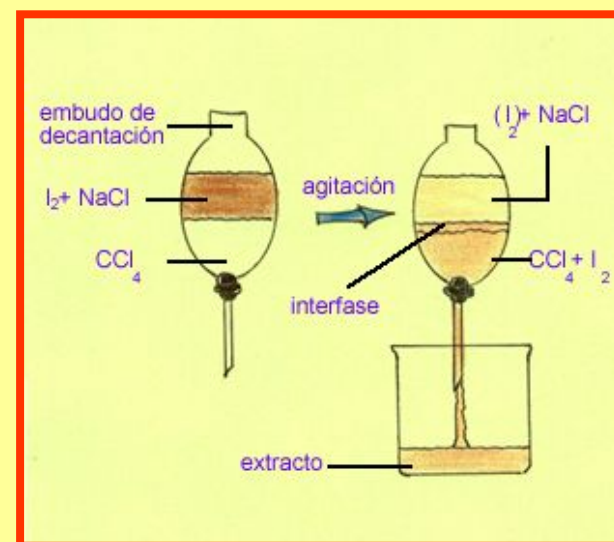
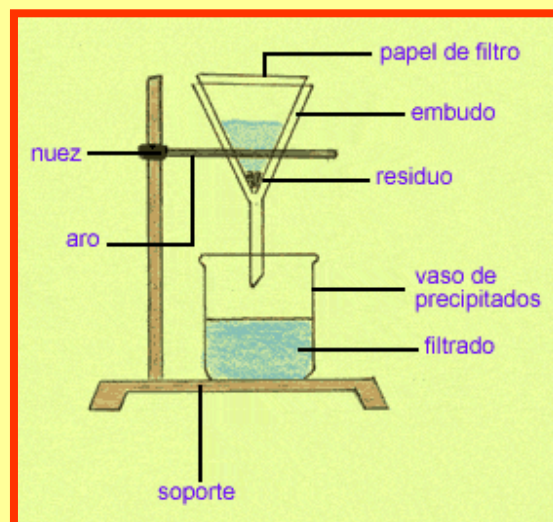


Análise químico: permite a identificación de biomoléculas, por exemplo identificación de glúcidos co reactivo de Fehling, proteínas mediante a reacción de Biuret, etc.



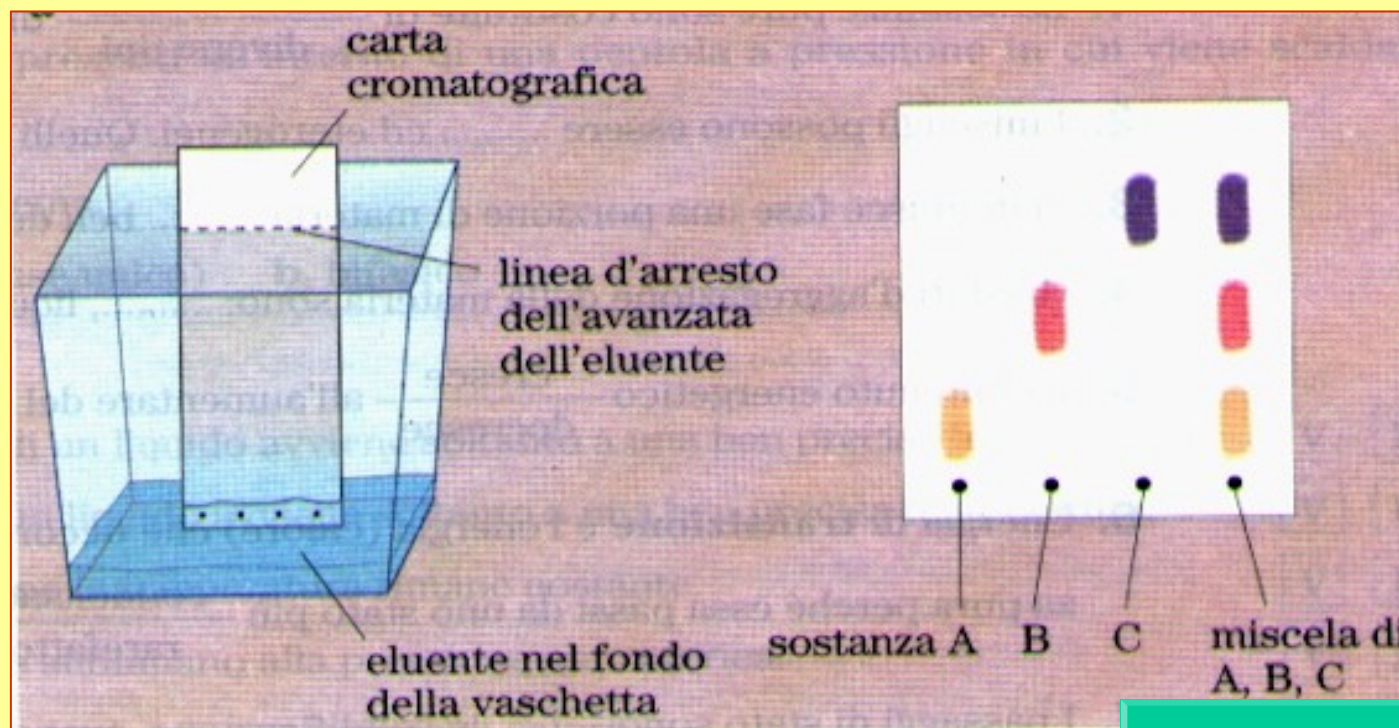
Métodos físicos:

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



CROMATOGRAFÍA

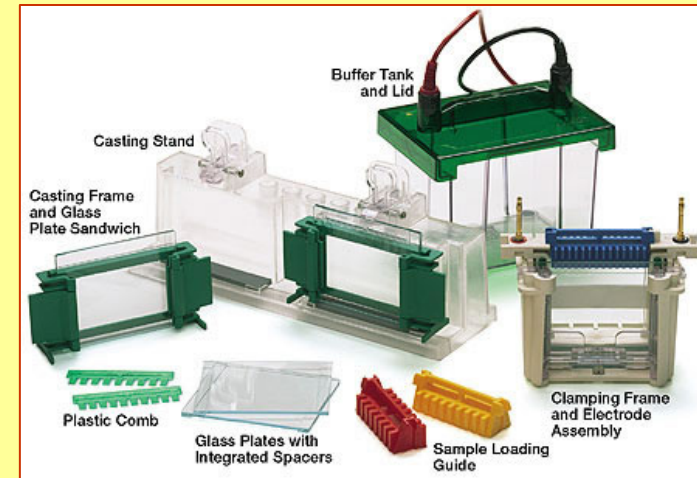
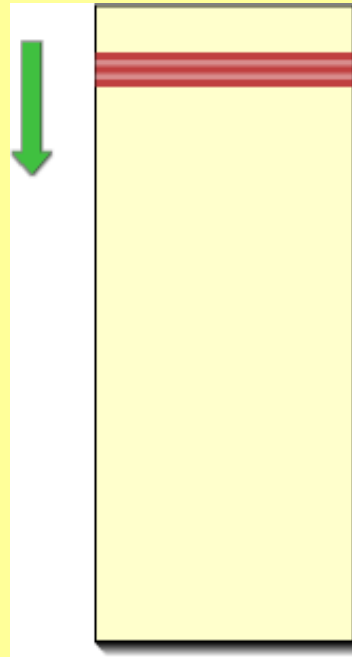
Conxunto de técnicas destinadas a fraccionar unha mezcla de compoñentes disoltos a medida que se desprazan ó través dunha matriz porosa. A técnica en xeral baséase na diferente afinidade que teñen as moléculas por un disolvente e pola trama porosa da matriz a través da que flúen.

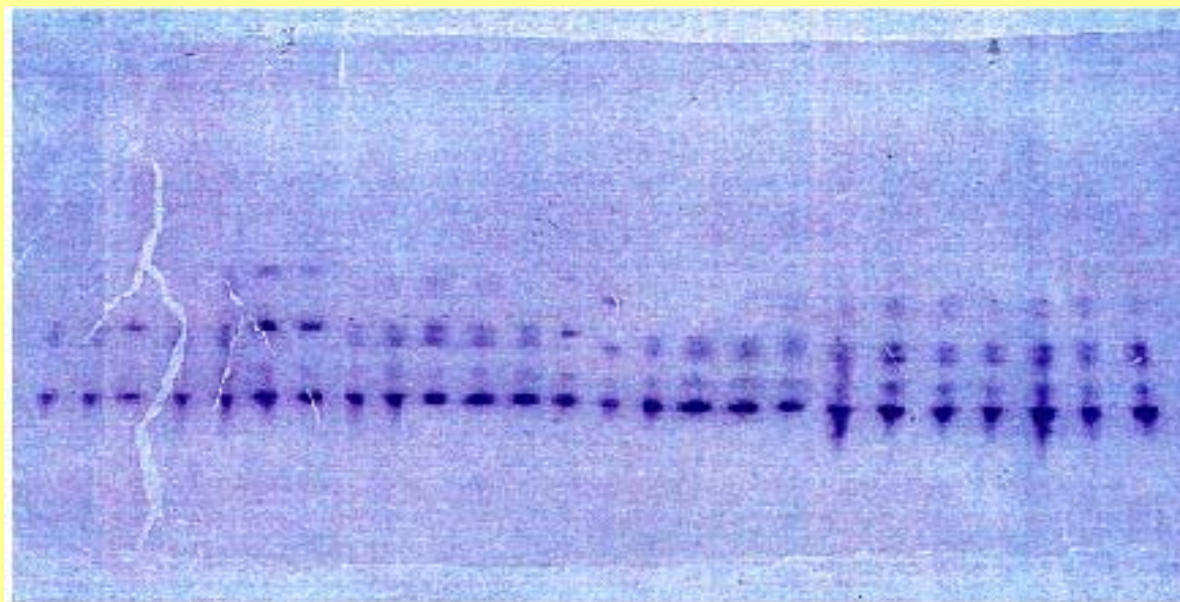


ELECTROFORESE

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.

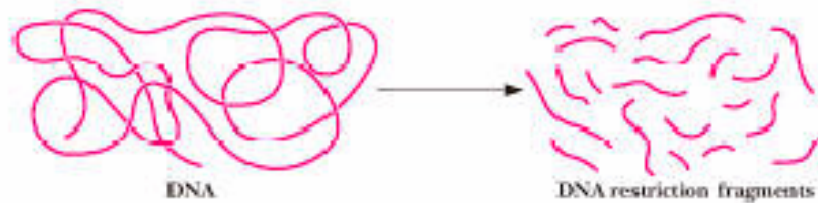




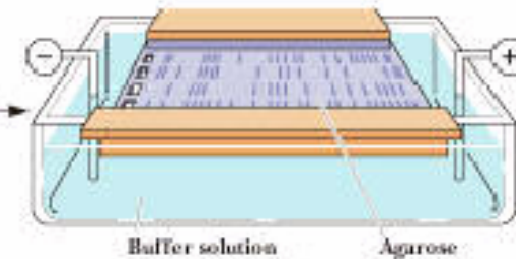
Gel de poliacrilamida tinguido con azul de Coomassie

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.

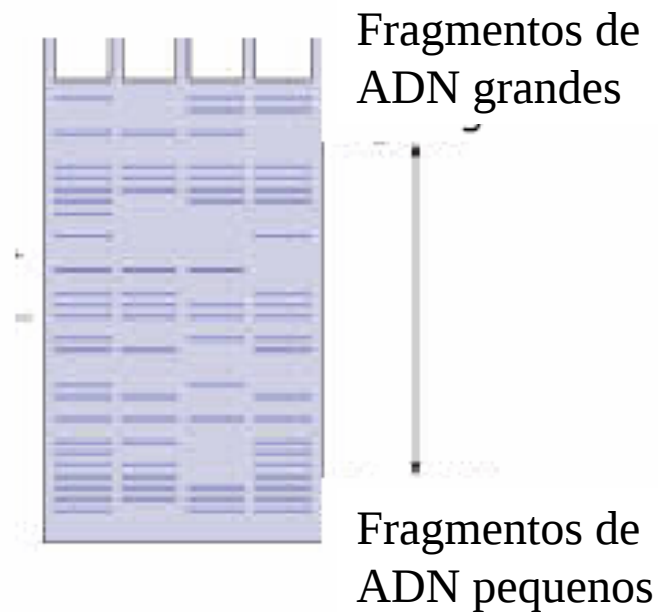
Rotura do ADN por encimas de restricción



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

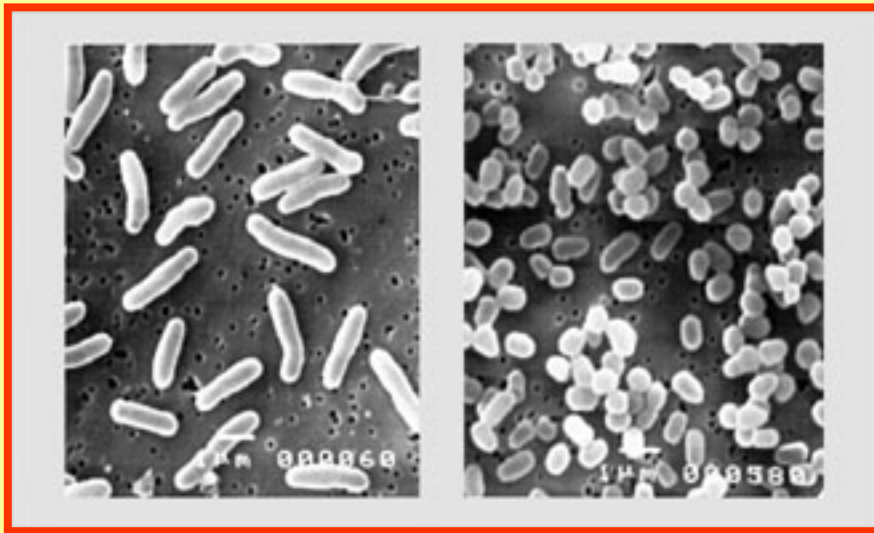


Electroforese

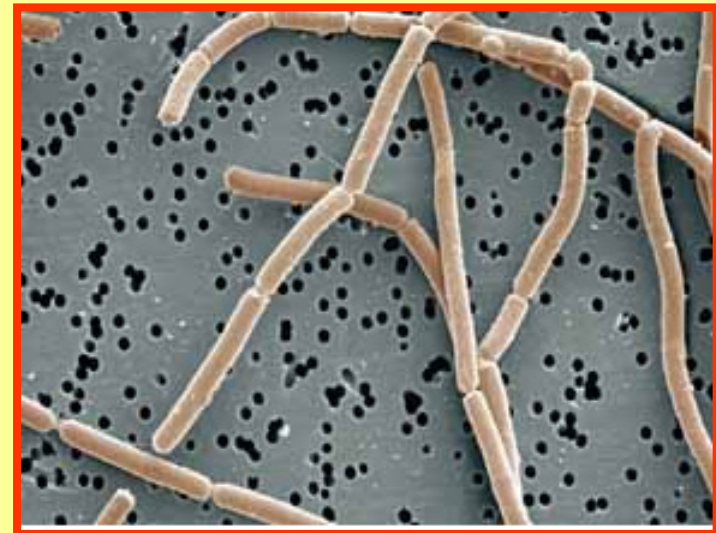
TIPOS DE ORGANIZACIÓN CELULAR

- ☐ Célula procariótica
- ☐ Célula eucariótica

❑ Célula procariótica



Archaeas. Bacterias extremófilas



Lactobacillus bulgaricus

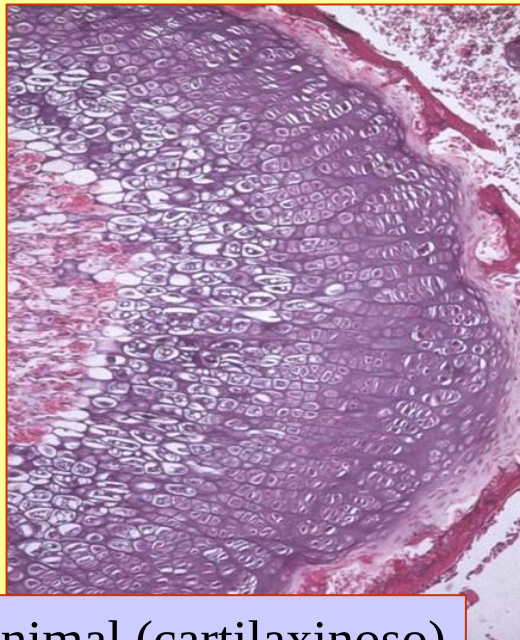
❑ Células eucarióticas



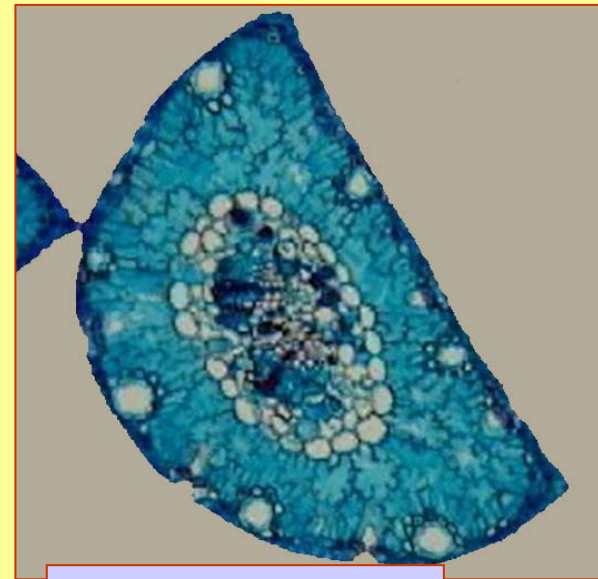
Organismo unicelular ameba



Organismo unicelular ciliado

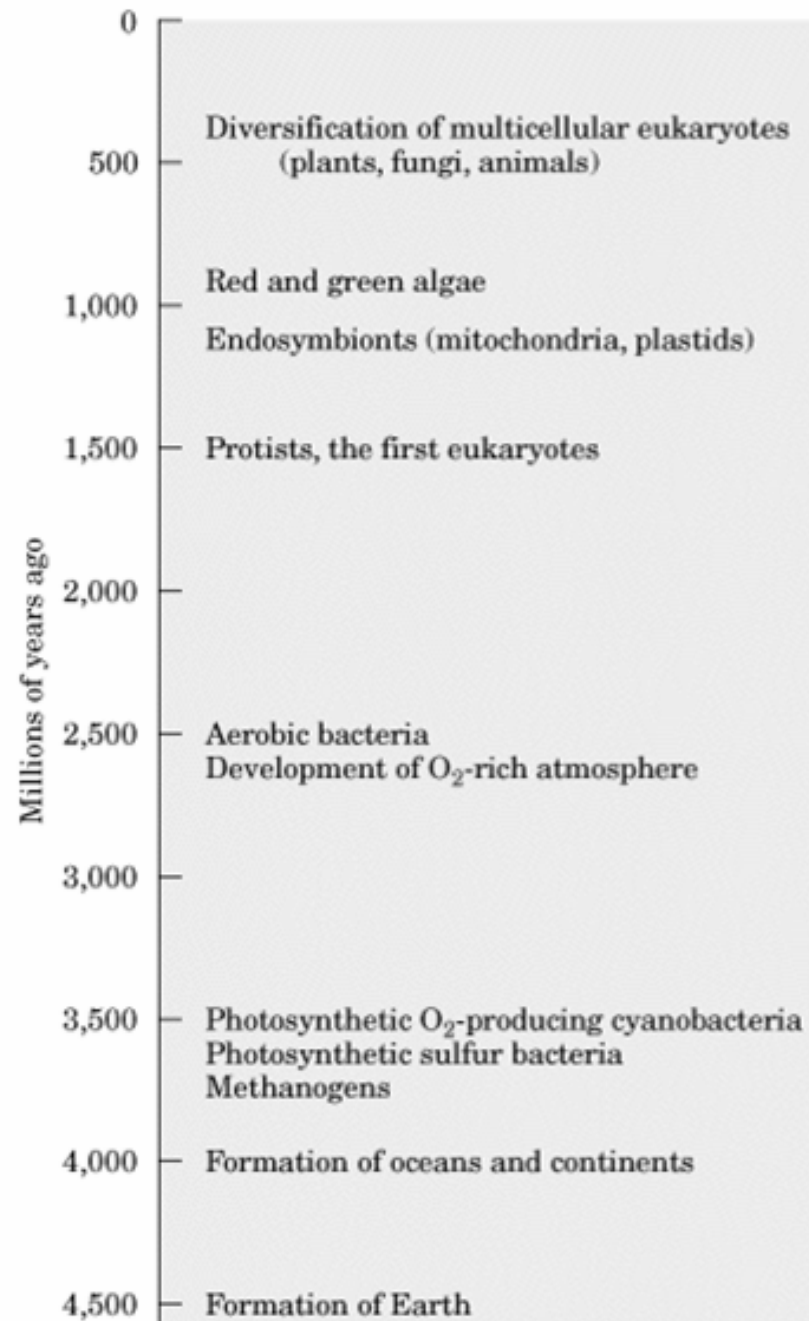


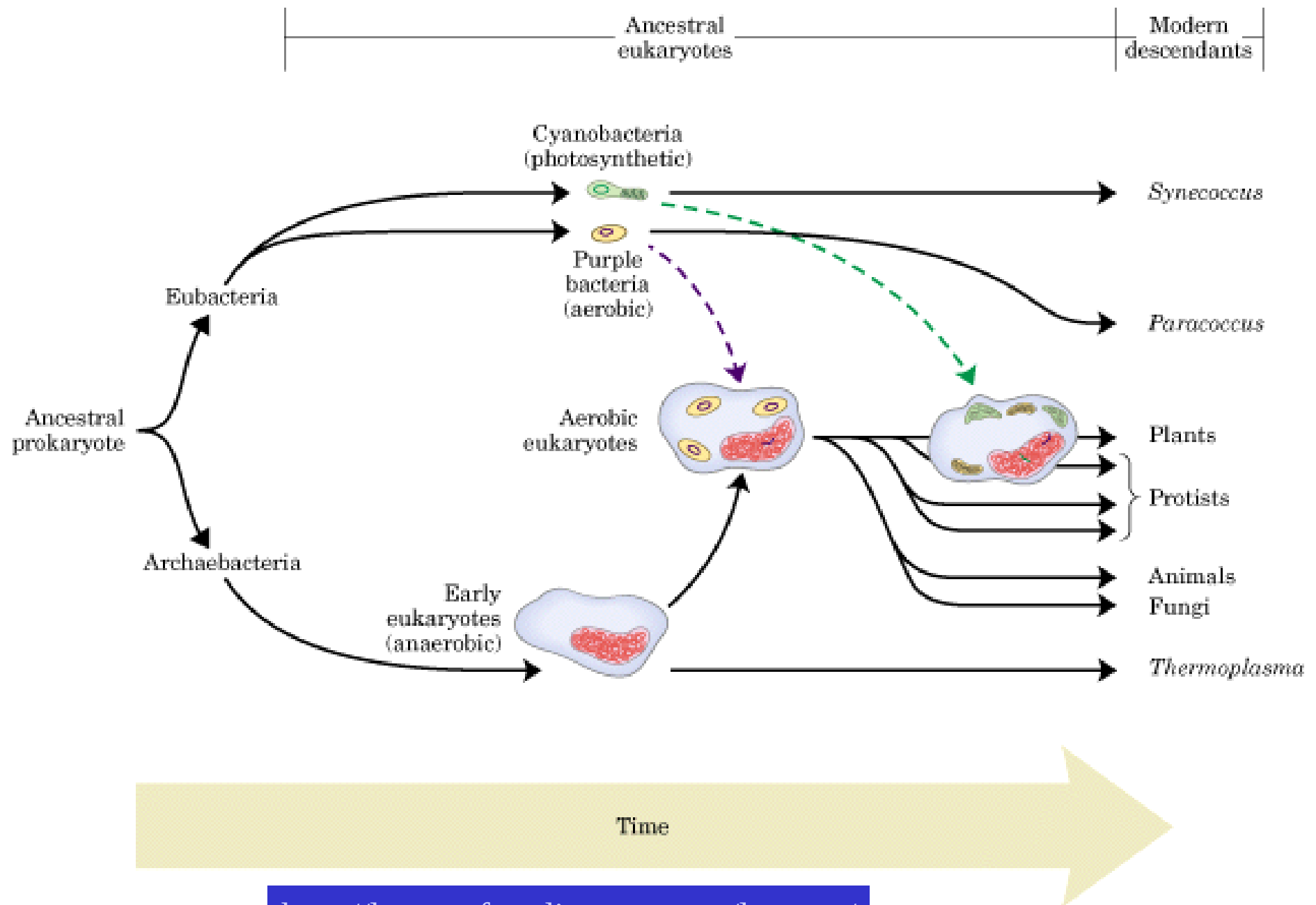
Tecido animal (cartilaxinoso)



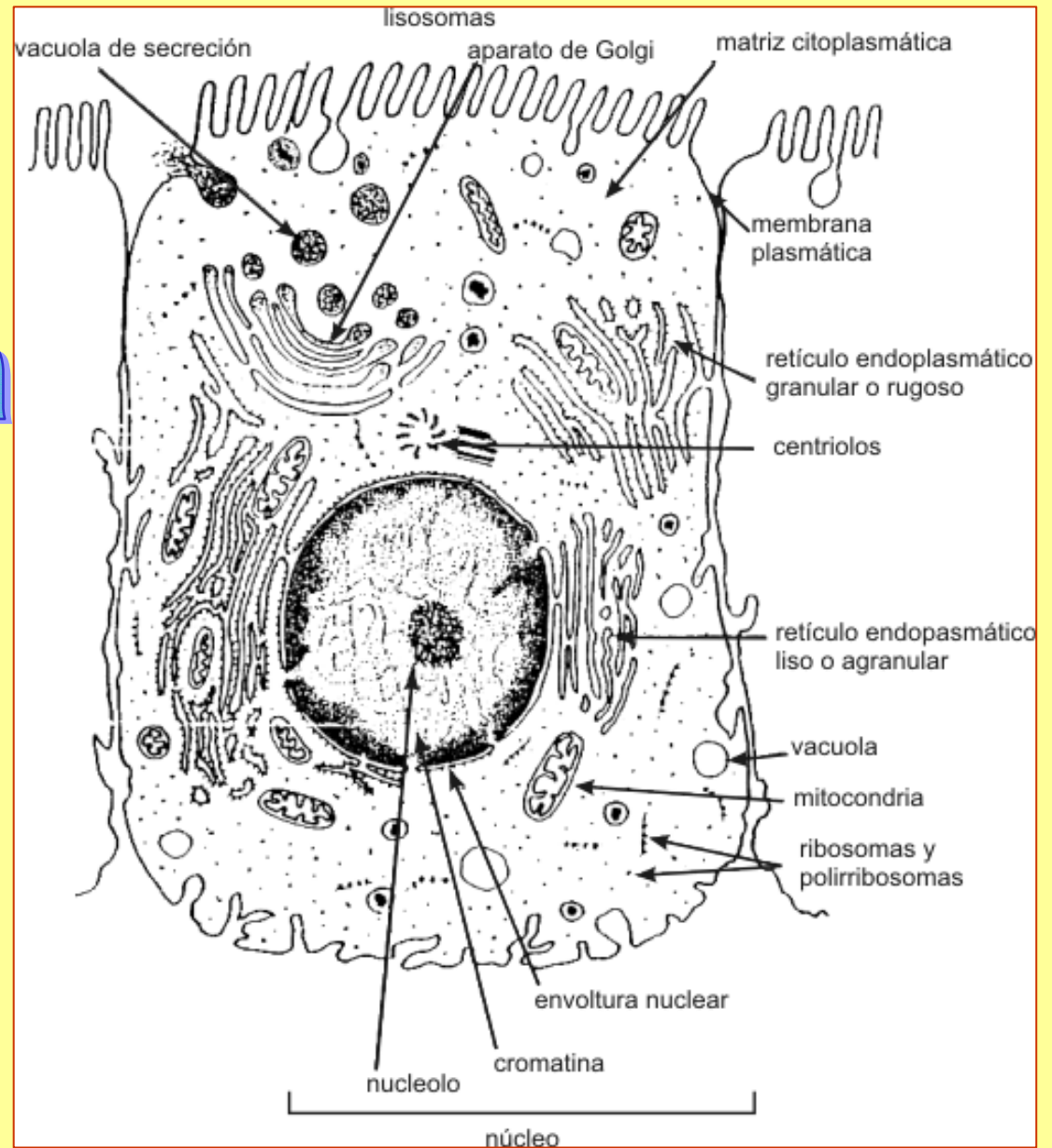
Tecidos vexetais

<http://laguna.fmedic.unam.mx/lenpres/>



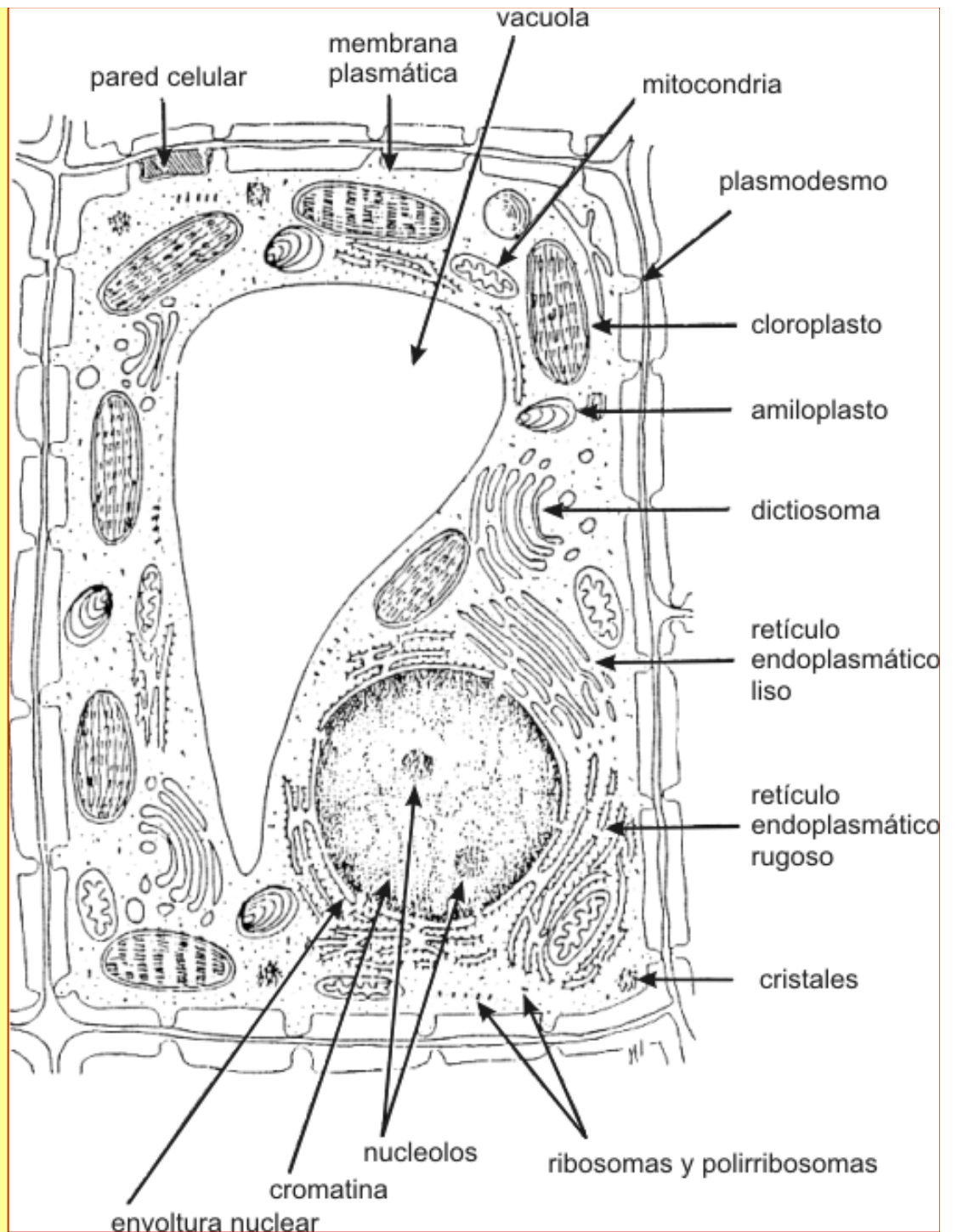


Estructura da célula eucariótica animal

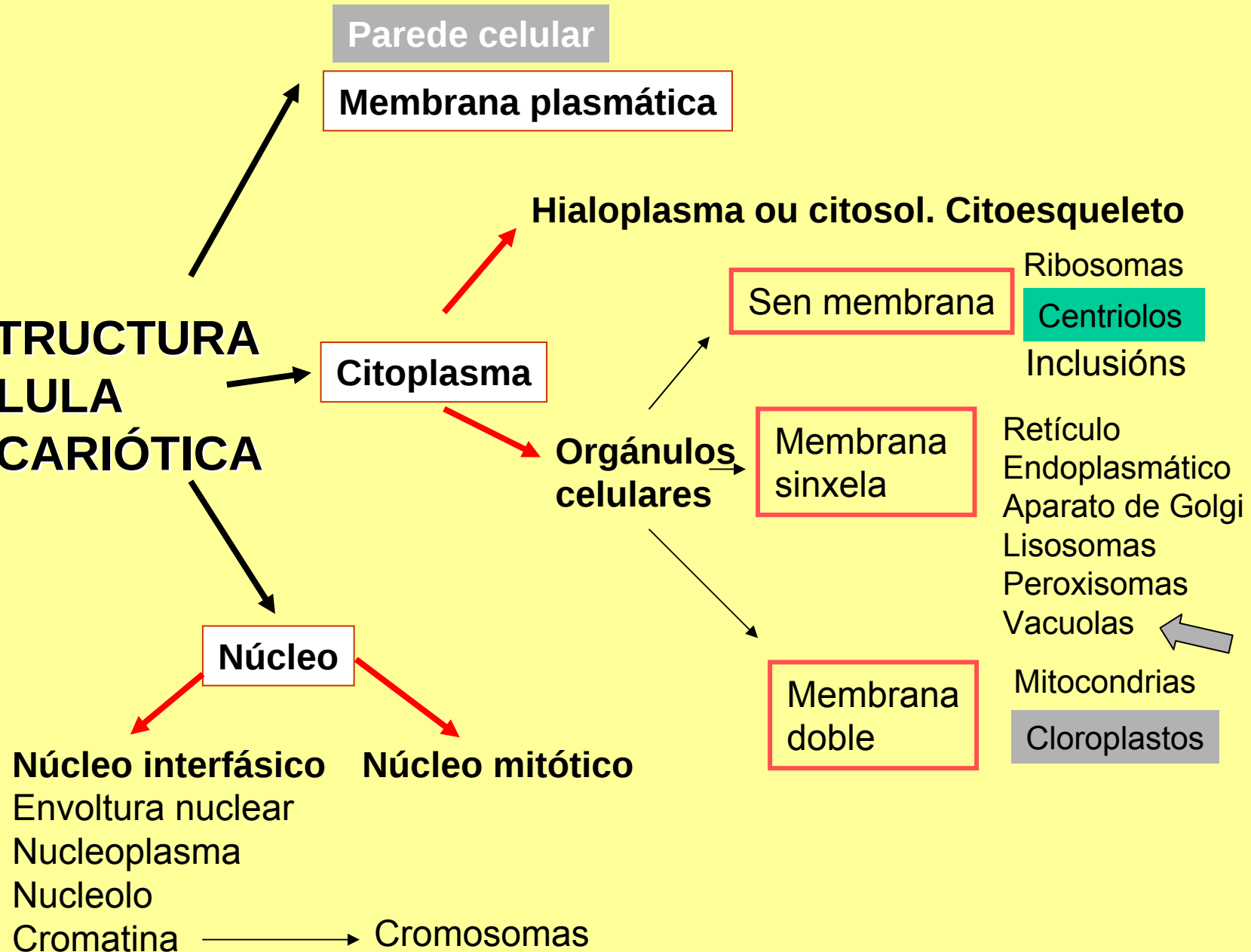


ESTRUCTURA DA CÉLULA EUCARIÓTICA VEGETAL

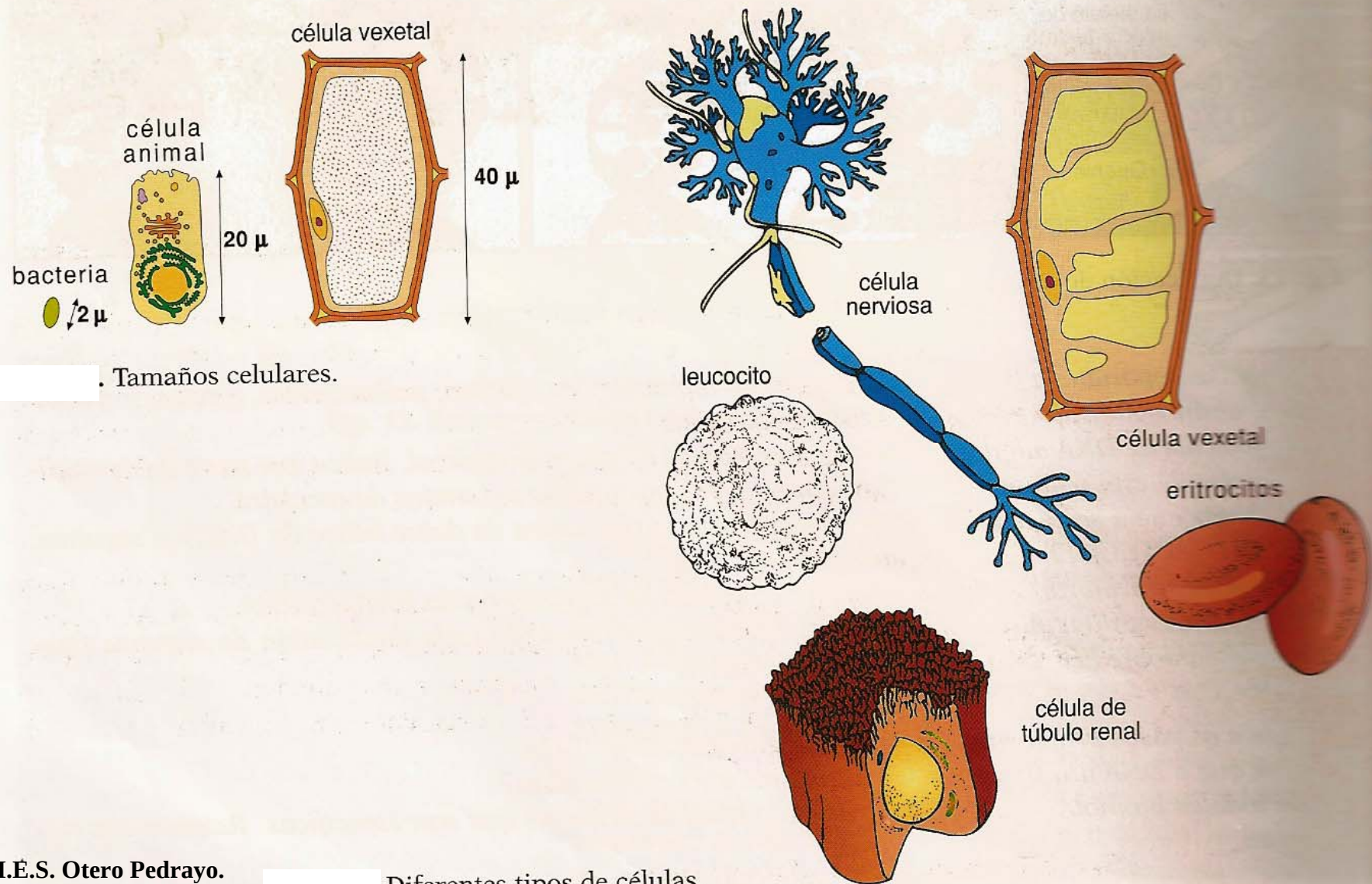
I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense



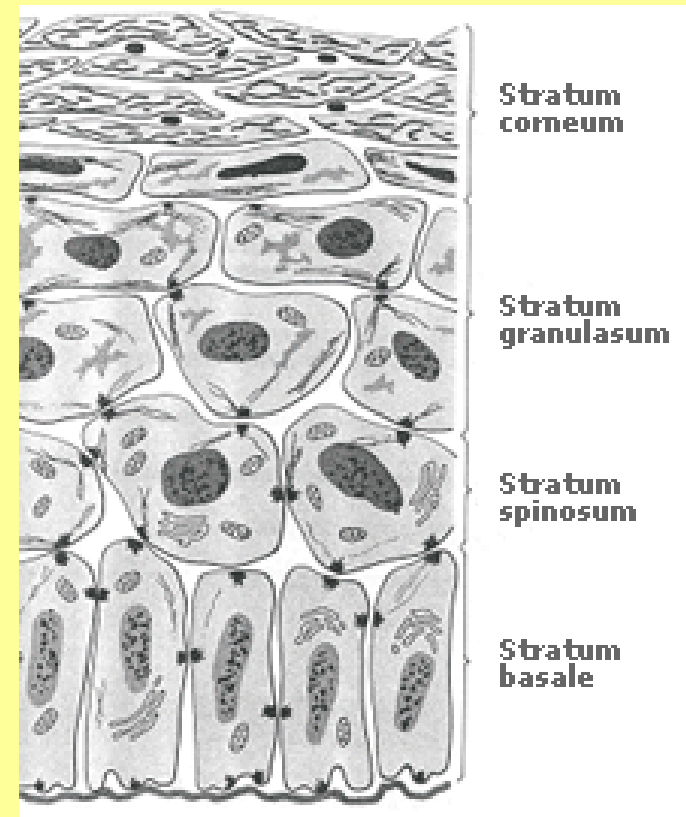
ESTRUCTURA CÉLULA EUCARIÓTICA



FORMA E TAMAÑO DAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS



MORFOLOXÍA DAS CÉLULAS



ÓRGANO PEL

CÉLULAS EPIDÉRMICAS POLIÉDRICA

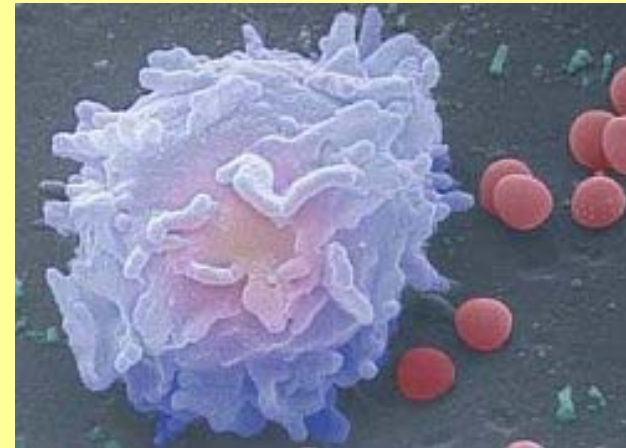


O SANGUE

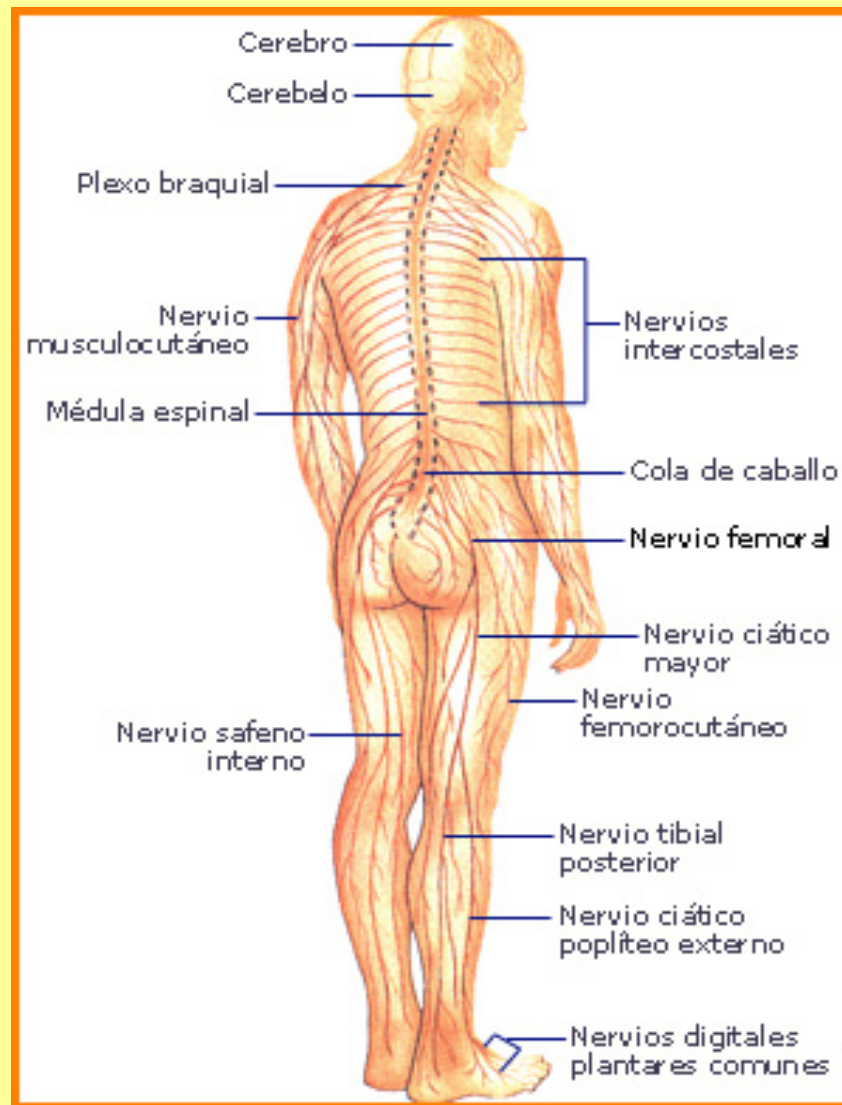
I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense



**GLÓBULOS
VERMELLOS
DISCO**

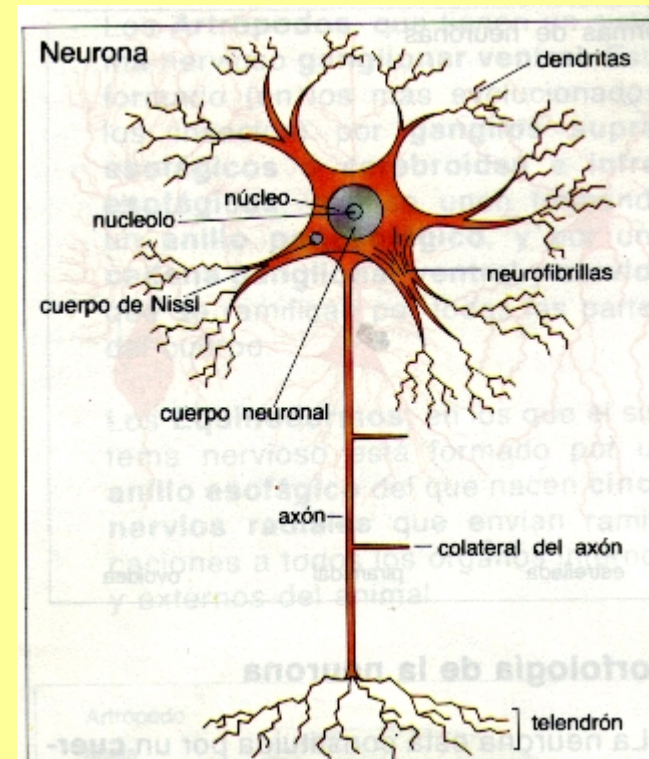


**GLÓBULOS
BRANCOS
VARIABLE**



SISTEMA NERVIOSO

I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense

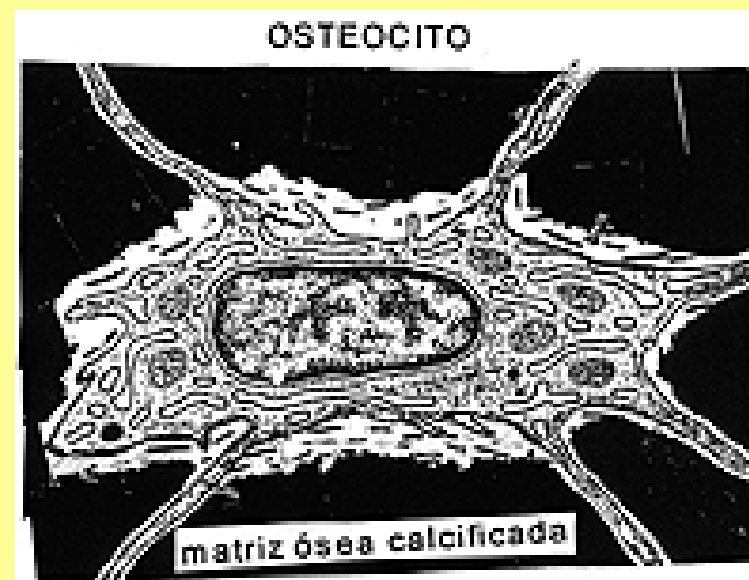


CÉLULAS NERVIOSAS OU NEURONAS ESTRELADAS

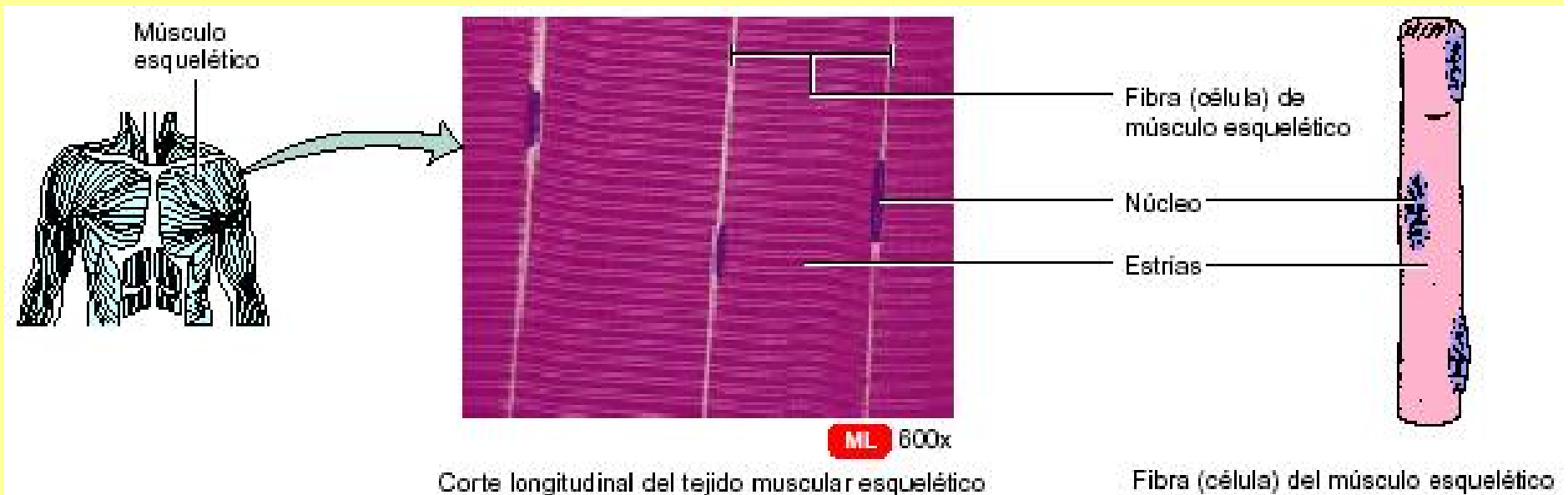


ÓRGANO ÓSO

I.E.S. Otero Pedrayo.
Ourense



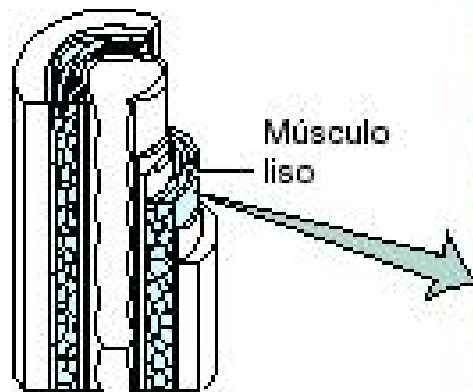
CÉLULAS ÓSEAS OU OSTEOCITOS ESTRELADAS



**SISTEMA
MUSCULAR**

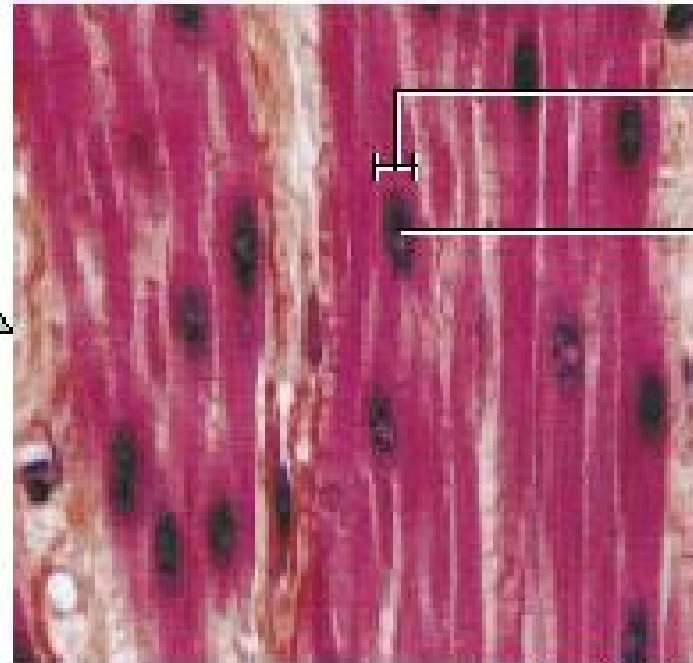
**TECIDO
MUSCULAR**

**CÉLULA MUSCULAR
ESTRIADA
CILÍNDRICA**



Arteria

Músculo
liso



ML 840x

Corte longitudinal del tejido muscular liso

Fibra (célula)
de músculo liso

Núcleo de una
fibra (célula) de
músculo liso

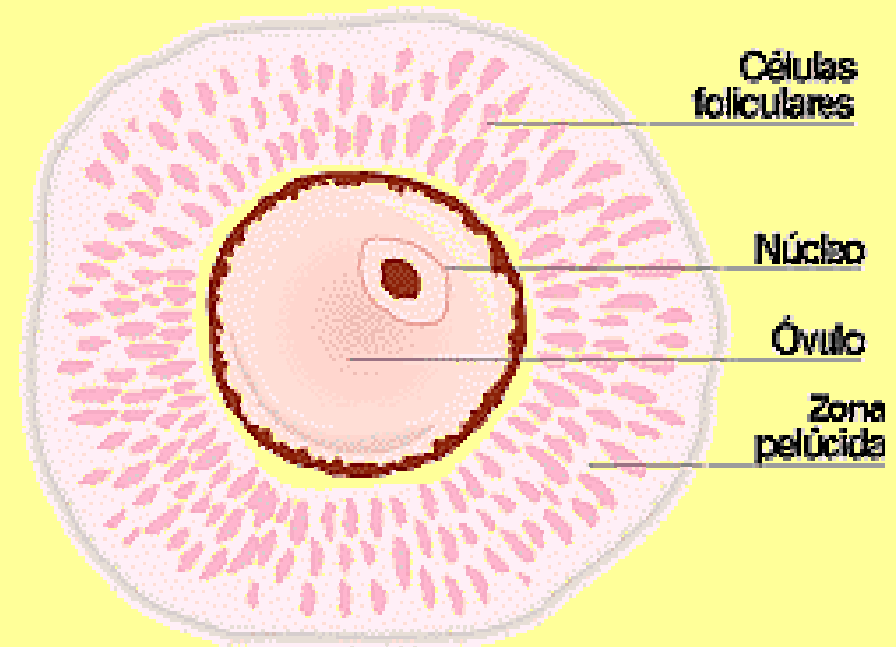
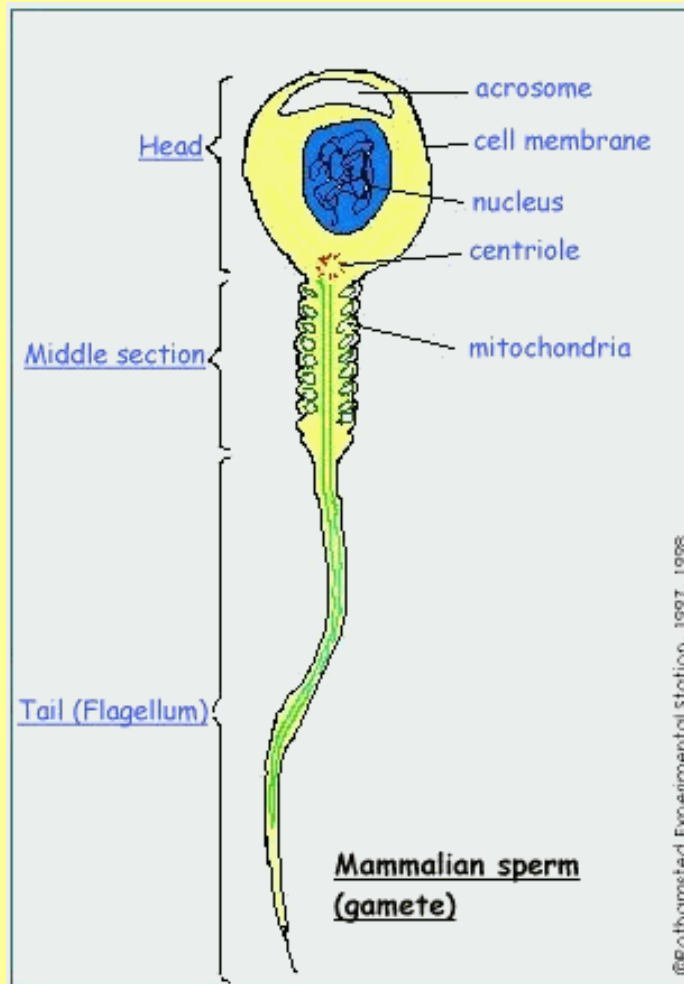


Fibra de músculo liso

**ÓRGANO
ARTERIA**

**TECIDO
MUSCULAR**

**CÉLULA
MUSCULAR LISA
FUSIFORME**



**ÓVULO
ESFÉRICO**

**ESPERMATOZOIDE
PISCIFORME**



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