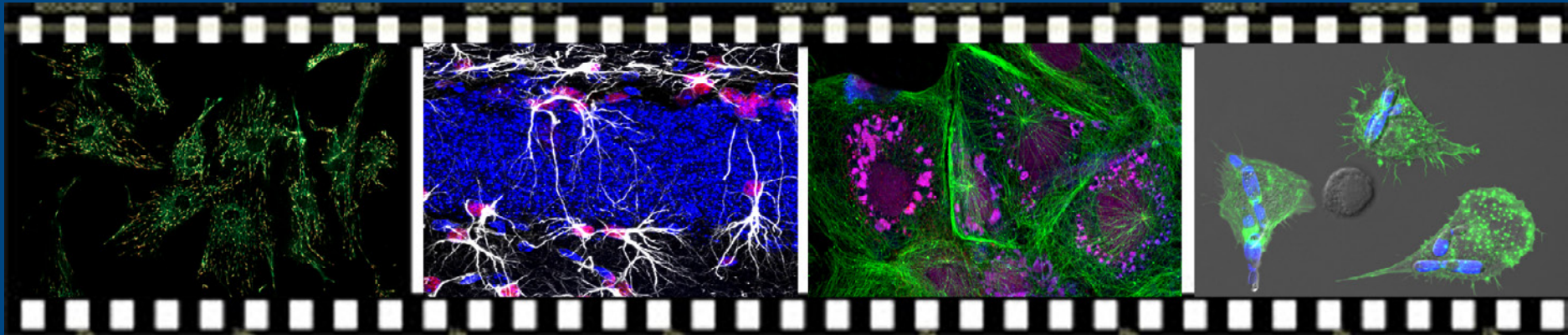


LA MICROSCOPIA CONFOCAL EN EL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III



Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Economía y Competitividad
Sinesio Delgado, 8
28029 MADRID (ESPAÑA)
Tel.: 91 822 22 74
Fax: 91 387 78 56

Catálogo general de publicaciones oficiales:
<http://publicacionesoficiales.boe.es>

Para obtener este informe de forma gratuita en Internet (formato pdf y ePub):
<http://publicaciones.isciii.es>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/es/>

EDITA: INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
Ministerio de Economía y Competitividad
N.I.P.O. en línea: 725-15-005-5
N.I.P.O. libro electrónico: 725-15-004-X
I.S.B.N.: 978-84-606-7432-0 (Free online version)
Imprime: Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado.
Avda. de Manoteras, 54. 28050 – MADRID

Autor

Fernando González Camacho

Prólogo

Helena Mira

Colaboradores

Silvia Hernández Esteban

Isabel Cortegano

Óscar Zaragoza

ÍNDICE

PRÓLOGO

Helena Mira	7
-------------------	---

PREFACIO

Fernando González-Camacho	8
---------------------------------	---

CAPÍTULO 1. LA FLUORESCENCIA, HACIENDO VISIBLE LO INVISIBLE

Fernando González-Camacho	9
Imagen 1: La microscopía de fluorescencia. Piel humana	10
1.1. La autofluorescencia	12
Imagen 2: Piojo (<i>Pediculus humanus</i>).....	12
1.2. Fluorescencia mediante proteínas fluorescentes.....	14
Imagen 3: Proteínas fluorescentes.....	14
1.3. Los colorantes fluorescentes.....	16
Imagen 4: Cultivo de células endoteliales	16
1.4. La Inmunofluorescencia.....	18
Imagen 5: Triple inmunofluorescencia	18
Imagen 6: Inmunofluorescencia indirecta en diagnóstico	20
1.5. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	22
Imagen 7: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
Imagen 8: Fluorescencia mediante la combinación del sistema RGB.....	24

CAPÍTULO 2. LOS CULTIVOS CELULARES

Silvia Hernández- Esteban, Fernando González-Camacho	27
Imagen 9: El cultivo de células	28
Imagen 10: La mitosis.....	30
2.1. Los cultivos celulares, un pilar en la investigación.....	32
Imagen 11: Cultivo celular primario de células de glioblastoma	32

2.2. Los cultivos celulares primarios	34
Imagen 12: Cultivo de neuronas	34
Imagen 13: Cultivo de neuronas	36
Imagen 14: Neurosféricas	38
2.3. Las líneas celulares	40
Imagen 15: Células Hela	40
CAPÍTULO 3. LOS COMPONENTES CELULARES	
Fernando González-Camacho	43
3.1. Citoesqueleto	43
Imagen 16: Citoesqueleto de actina	44
Imagen 17: El citoesqueleto	46
3.2. Los lípidos	48
Imagen 18: Lípidos y lámina B	48
3.3. El aparato de Golgi	50
3.4. El retículo endoplásmico	50
Imagen 19: Núcleos y aparato de Golgi	50
3.5. Los núcleos	52
Imagen 20: Núcleos y retículo endoplásmico	52
3.6. Las mitocondrias	54
Imagen 21 Red de mitocondrias marcadas con el compuesto JC1	54
Imagen 22: Mitocondrias y núcleos	56
Imagen 23: Mitocondrias, núcleos y citoesqueleto	58
CAPÍTULO 4. NUESTRAS DEFENSAS	
Isabel Cortegano	61
4.1. Los anticuerpos	62
Imagen 24: Opsonización. Neutrófilos fagocitando bacterias	62
4.2. Los componentes celulares de las defensas	64
Imagen 25: Los linfocitos	64
Imagen 26: los macrófagos	66

Imagen 27: Neutrófilos	68
Imagen 28: Microglía	70
Imagen 29: Lesión cerebral y microglía	72
Imagen 30: Megacariocitos	74
Imagen 31: Proplaquetas y plaquetas	76
CAPÍTULO 5. LOS PATÓGENOS	
Óscar Zaragoza	79
5.1. Los hongos patógenos	80
Imagen 32: <i>Cryptococcus neoformans</i>	80
Imagen 33: <i>Candida tropicalis</i>	82
5.2. Bacteriología	84
Imagen 34: <i>Legionella pneumophila</i>	84
5.3. Parásitos	86
Imagen 35: Leishmania	86
5.4. Los virus	88
Imagen 36: Rotavirus	88
CAPÍTULO 6. LOS MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA	
Fernando González-Camacho	91
Imagen 37: Hipocampo de ratón	92
Imagen 38: Esquema de parte del cerebro de ratón	94
Imagen 39: Región SVZ (zona subventricular) del cerebro de ratón	96
Imagen 40: Región SVZ	98
Imagen 41: Hipocampo del cerebro de ratón p8	100
Imagen 42: Brazo del giro dentado del hipocampo	102
Imagen 43: Tejido de mama	104
Imagen 44: Biopsia de piel humana	106
USUARIOS PARTICIPANTES	109

Prólogo

Este volumen elaborado por el Dr. Fernando González Camacho nace con una clara vocación divulgadora y constituye, además de un reconocimiento al trabajo científico realizado en la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Salud Carlos III, una verdadera invitación a los lectores para que valoren la riqueza del mundo microscópico y profundicen en el conocimiento de la biología celular.

La diversidad y la complejidad son características intrínsecas de la vida presentes ya a nivel de las mismas células o unidades vitales mínimas que conforman a todos los seres vivos sin excepción. Nuestro cuerpo contiene alrededor de cuarenta billones de células de formas y tamaños tremendamente diversos, desde los sencillos eritrocitos hasta las neuronas más sofisticadas, con morfologías muy extensas y elaboradas. Las estructuras internas de las células, los orgánulos que albergan, sus dinámicas, las interacciones que establecen entre ellas y con el ambiente, su ciclo vital, su respuesta frente a los patógenos y su desregulación en la enfermedad son el centro de muchos de los estudios llevados a cabo en el Instituto de Salud Carlos III. Toda esta complejidad biológica se pone de manifiesto al ser observada a través del microscopio confocal de fluorescencia, haciéndose entonces «visible lo invisible», como el propio autor de la obra nos desvela.

En las páginas de este volumen podemos admirar desde imágenes de cultivos celulares y componentes subcelulares, como el citoesqueleto o las redes de mitocondrias, hasta imágenes de las células de defensa de nuestro organismo, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, sin olvidar a los patógenos. Este recorrido por los diferentes capítulos del libro incluye además imágenes inéditas de las investigaciones desarrolladas en el Instituto de Salud Carlos III, con panorámicas espectaculares de múltiples tejidos y detalles sorprendentes del interior celular. La belleza de las fotografías se enaltece con los textos que las acompañan, poniéndose de manifiesto la indudable sensibilidad artística del autor la obra. Sin duda, el Dr. Fernando González Camacho ha sabido ensalzar la belleza de estas imágenes naturales, permitiéndonos disfrutar también del plano artístico que nos ofrece la ciencia.

En los años que han transcurrido desde su incorporación al Instituto de Salud Carlos III, el Dr. Fernando González Camacho ha apoyado con decisión el esfuerzo de nuestra investigación científica. En nombre de todos los investigadores e investigadoras de esta Institución, le agradezco su incansable labor y le felicito sin reservas por su excelente trabajo.

Dr. Helena Mira

*Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas
Instituto de Salud Carlos III*

Prefacio

Desde mis primeros comienzos en la investigación siempre he considerado que la divulgación científica es un pilar que debe sostener a la investigación. Se trata de hacer llegar al ciudadano de manera sencilla aquello de lo que oyen hablar pero que les resulta tan lejano y extraño. Resulta esencial tener presencia en la vida cotidiana de las personas.

Desde hace ya algunos años trabajo con la microscopía de fluorescencia y desde el primer día me ha resultado fascinante, tanto por los resultados que se obtienen como por la calidad artística que se puede llegar a ver en algunos casos. Creo que los que tenemos la suerte de poder trabajar en este ámbito del conocimiento tenemos en nuestras manos una gran herramienta con la que llegar al ciudadano.

En mis etapas previas al ISCIII siempre he intentado acercar mis experiencias profesionales al público en general con pequeñas aportaciones individuales. Fue con la llegada al Instituto donde se me abrieron las puertas para desarrollar de una manera más amplia aquella inquietud. Todo comenzó con la idea de poner una exposición de fotografía en mi barrio de los resultados más estéticos y representativos del trabajo que se hacía en el microscopio confocal. Después, gracias al entusiasmo y el empuje de algunos de los implicados, la exposición se hizo itinerante por diferentes municipios de España para, finalmente plasmarse en esta obra, un libro a caballo entre una memoria no exhaustiva de los trabajos más representativos que se hacen en el microscopio confocal y una obra divulgativa.

Esto ha sido posible gracias a la buena voluntad de todas las personas que se han visto implicadas en el Instituto, desde el Gabinete de Prensa hasta la Dirección del Centro Nacional de Microbiología. Pero nada habría sido posible sin el apoyo que me ha brindado siempre prácticamente la totalidad de los usuarios del microscopio, que han sido incondicionales a todas y cada una de las propuestas que les he ido haciendo. Mi más sincero agradecimiento a todos ellos.

Fernando González Camacho
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III

CAPÍTULO 1. LA FLUORESCENCIA, HACIENDO VISIBLE LO INVISIBLE

La microscopía de fluorescencia se basa en la capacidad que tienen ciertas moléculas para absorber energía procedente de una estrecha banda del espectro de la luz, habitualmente expresado con el valor de la longitud de onda donde tiene su máxima absorción seguido de la emisión de luz en un rango de longitud de onda mayor. Gracias a esta propiedad de absorber y emitir luz en determinadas franjas del espectro de luz y a la existencia de tinciones, anticuerpos y sondas específicas, se pueden combinar obteniendo resultados espectaculares. Estos resultados se pueden enmarcan en su contexto celular, de órgano o de organismo ([imagen 1](#)).

Los microscopios de epifluorescencia comenzaron a utilizarse de manera habitual en los laboratorios a principios de la década de los 70 del siglo pasado. Las primeras aplicaciones en las que se empleó se basaron en la observación de la fluorescencia primaria, o autofluorescencia, que contienen determinadas sustancias ([imagen 2](#)). Pero el boom no llegaría hasta los años 90, cuando se comenzó a manipular el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), aislada de la medusa *Aequorea victoria*, mejorando sus propiedades y obteniendo una serie de proteínas derivadas capaces de ser excitadas y emitir fluorescencia en otras longitudes de onda ([imagen 3](#)).

Junto a este hecho transcendental ocurrieron otros dos que supusieron colocar a la microscopía de fluorescencia como punta de lanza en muchas líneas de investigación biomédica. Por un lado se desarrolló el sistema confocal que permitía obtener imágenes de alta calidad y resolución eliminando la luz fuera de foco y por otro, la accesibilidad a equipos informáticos potentes, capaces de almacenar gran cantidad de información a una velocidad aceptable y a unos costes razonables.

Los métodos más sencillos en los que se utiliza la fluorescencia es mediante el empleo de colorantes que tienen afinidad por un componente determinado de la célula, de todos los posibles el más empleado es la tinción del núcleo celular mediante el empleo de intercalantes de DNA, como el DAPI, SITOX, o el DRAQ5, pero existen muchos más colorantes como el mitotracker, que tiñe mitocondrias, lisotracker para lisosomas, faloidina para tinción del citoesqueleto de actina, tinción de membranas, de lípidos ([imagen 4](#)).

Estas tinciones suelen combinarse con procesos más complejos como son las inmunofluorescencias, en las que se emplean anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos que detectan proteínas determinadas. Lo más habitual es el empleo de un anticuerpo, aunque también lo es un doble

marcado, e incluso un triple, que combinado con una tinción con un colorante obtenemos muestras con cuatro marcajes (**imagen 5**). La técnica de inmunofluorescencia es muy utilizada tanto en investigación como en diagnóstico (**imagen 6**).

Por otro lado, en investigación y diagnóstico de enfermedades genéticas es muy común el empleo de sondas de DNA marcadas con fluorocromos, esta técnica se conoce como hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (**imagen 7**).

Existen otros métodos de marcar e incorporar fluorescencia en nuestras muestras, como son el empleo de *quantum dots* o la incorporación de virus (transducción) con fluorescencia (**imagen 8**). Otro grupo de proteínas fluorescentes son las fotoactivables, que no son fluorescentes hasta que no se les activa con una longitud de onda determinada; y las proteínas fotoconvertibles, que emiten fluorescencia a una determinada

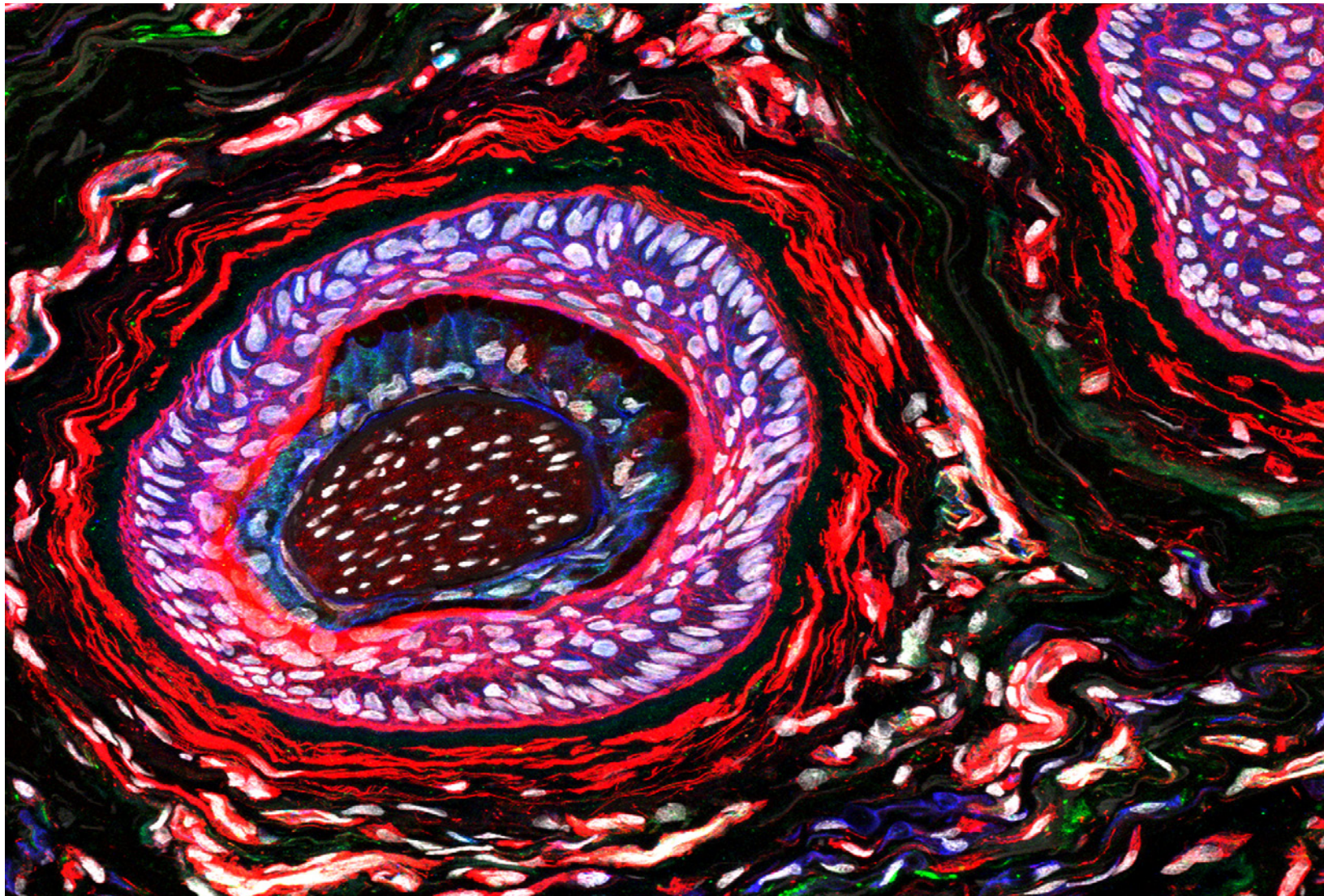
longitud de onda y al irradiarla emite en otra longitud diferente, esta técnica se emplea en experimentos con células vivas, para individualizar orgánulos, proteínas o células.

Imagen 1: La Microscopía de fluorescencia. Piel humana

Corte transversal de un pelo a la altura de la dermis observado mediante el microscopio de fluorescencia confocal utilizando el objetivo de 40x. En rojo se tiñe la tubulina y en blanco los núcleos, en verde y en azul se detectan diferentes proteínas.

A las células y los tejidos se les incorpora moléculas capaces de emitir fluorescencia que luego es observada por este tipo de microscopios.

Se pueden marcar de manera específica diferentes moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos.



Por cortesía del Dr. Miguel Calero y la Dra. Alejandra Kun (UFIEC)

1.1. LA AUTOFLUORESCENCIA

Llamamos autofluorescencia a la fluorescencia que emite de forma natural la muestra que estamos observando.

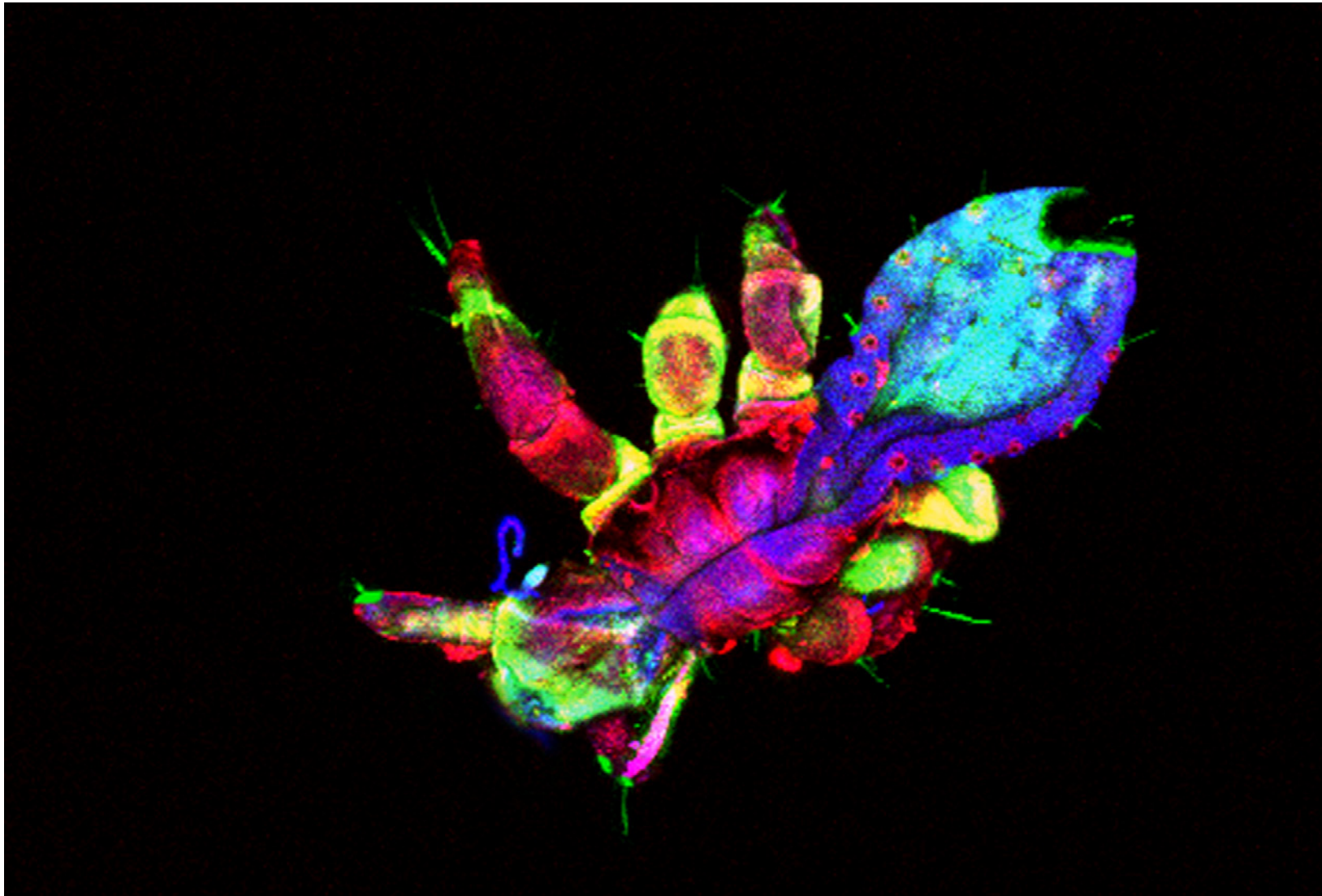
En la naturaleza existen multitud de sustancias y estructuras capaces de emitir fluorescencia de manera natural, es a lo que llamamos fluorescencia primaria. Esta autofluorescencia es especialmente abundante en plantas, insectos y organismos marinos, pero nuestro ámbito de trabajo no está exento de este fenómeno; algunas de estas estructuras capaces de emitir fluorescencia son el colágeno y la elastina, los eritrocitos y la lipofucsina. Este último compuesto es especialmente abundante en neuronas, células gliales, células del músculo cardíaco y en la piel, y aparecen con mayor abundancia en los animales de mayor edad frente a los más jóvenes.

Cuando la intención es marcar algún componente de manera específica, la autofluorescencia puede suponer un verdadero obstáculo a superar, la fluorescencia primaria puede complicar enormemente un experimento.

Imagen 2: Piojo (*Pediculus humanus*)

La imagen se corresponde a la fluorescencia que emite de manera natural, fluorescencia primaria (autofluorescencia) una ninfa de piojo en los canales azul, verde y rojo. La gama de colores es el reflejo de la mezcla de estos con diferentes grados de intensidad.

Para poder observar la fluorescencia la muestra se debe iluminar con un color determinado (con una longitud de onda de excitación) y observar la luz procedente de la preparación con otro color determinado (longitud de onda de emisión).



Dr. Fernando González-Camacho (CNM)

1.2. FLUORESCENCIA MEDIANTE PROTEÍNAS FLUORESCENTES

La reina de las proteínas fluorescentes es la GFP (Green Fluorescent Protein), se ha convertido en una herramienta clave para la observación de la expresión génica.

Esta proteína se puede incorporar a las células a través de un plásmido que contiene su secuencia genética y promover su expresión. Esta práctica es muy habitual en estudios *in vivo*, tanto en organismos como en cultivos celulares, para permitir el seguimiento de las células a lo largo del tiempo.

Una segunda opción, y al alcance de cualquier laboratorio de biología molecular o celular, es unir el gen de la GFP al gen de una proteína de interés de tal forma que se dé una expresión conjunta.

En este caso la proteína fluorescente serviría como «testigo» que nos delate la presencia y localización de nuestra proteína de interés, seguir su dinámica o la interacción con otras proteínas.

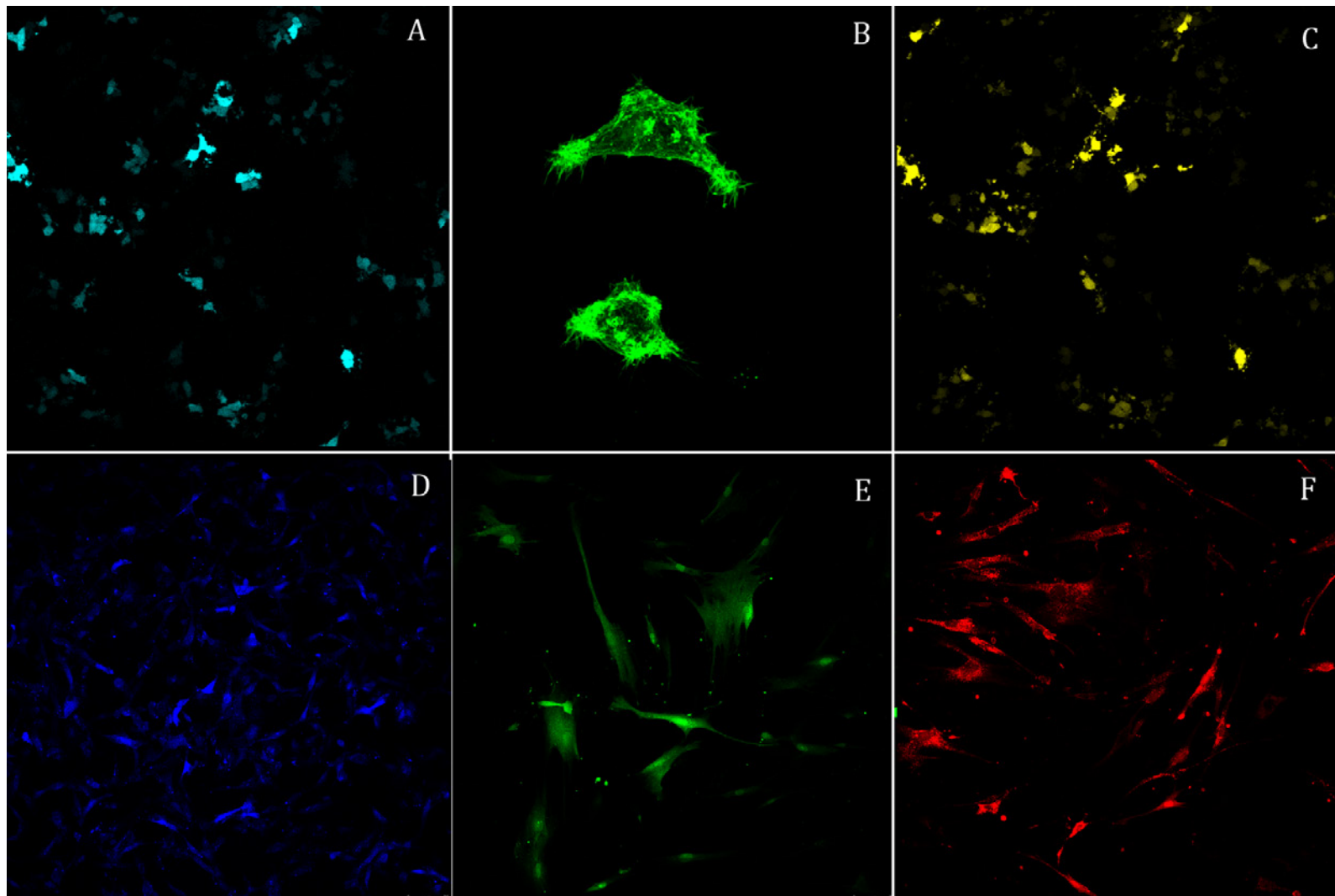
Los trabajos pioneros con la GFP supusieron el Premio Nobel de Química en el año 2008 a tres de los investigadores, a Osamu Shimomura por descubrirla y purificarla (1962), a Martin Chalfie por expresarla por primera vez en animales (*Caenorhabditis elegans* y *Escherichia coli*) (1994) y al Roger Y. Tsien por descubrir que la mutación en un codón mejoraba sus propiedades luminiscentes y determinó la estructura cristalina de la GFP mutada, esta versión de la GFP se conoce como EGFP «Enhanced Green Fluorescent Protein» (1995).

El gen que codifica para la GFP fue clonado por Douglas C. Prasher en 1992 y determinó la secuencia primaria de la proteína, lamentablemente, Prasher se quedó fuera del premio. Tsien siguió trabajando en la modificación de la GFP para obtener derivados que emitiesen fluorescencia en otras longitudes de onda, consiguió versiones que emiten en azul (BFP) y en amarillo (YFP). Posteriormente se encontraron proteínas similares a la GFP en otros organismos marinos, como la DsRed obtenida a partir del cnidario *Discosoma sp.*, a esta proteína que emite en rojo se le llamó DsRed, de la que se obtuvo una versión modificada genéticamente para mejorar sus propiedades a la que se le denominó mRFP.

Imagen 3: Proteínas fluorescentes

A: CFP (Cyan Fluorescent Protein). **B:** GFP fusionada a la proteína RAS incorporada a células HeLa mediante una transfección. **C:** YFP (Yellow Fluorescent Protein). A y C forman parte de una construcción en la que se encuentran flanqueando a una proteína sustrato para la Jun Kinasa. CFP e YFP son un par de fluorocromos muy empleado en la técnica FRET utilizándose como biosensores. Ésta permite observar cuándo y dónde se produce la unión de nuestra proteína de interés a su sustrato.

D: Fluorocromo Cerulean, con un espectro de emisión de fluorescencia a 475nm (azul); **E:** Fluorocromo Venus, con emisión de fluorescencia a 528nm (verde); **F:** fluorocromo mCherry, con emisión de fluorescencia a 610nm (rojo).



*Por cortesía del Dr. Marçal Vilar (UFIEC)
Por cortesía de la Dra Arantazu Alfranca (IIER)*

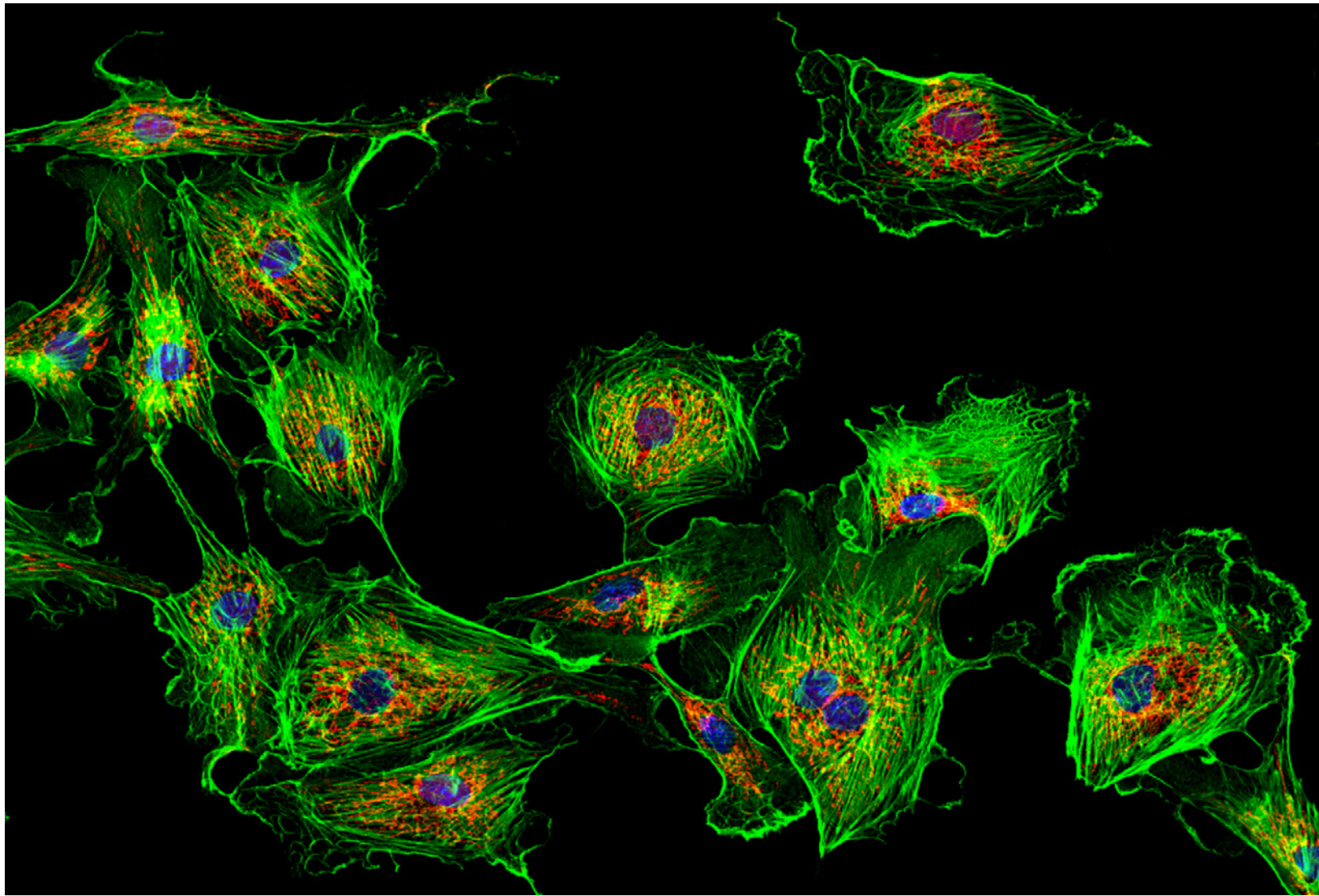
1.3. LOS COLORANTES FLUORESCENTES

La manera más sencilla de teñir una muestra fluorescentemente es mediante el empleo de colorantes que tienen afinidad específica dentro de una célula. El caso más extendido es la tinción de los núcleos con sustancias fluorescentes que se intercalan en la doble hélice del ADN, tal es el caso del DAPI, el DRAQ5 y el Hoetchst. Otros elementos celulares que se pueden teñir de manera específica son el citoesqueleto, las mitocondrias, los lípidos, los

lisosomas, etc. Estos métodos de tinción son de uso muy común, acompañando a otras técnicas de marcado como la inmunofluorescencia.

Imagen 4: Cultivo de células endoteliales

Cultivo de células endoteliales. En rojo mitocondrias teñidas con el colorante MitoTracker Red, en verde los filamentos de actina teñidos con faloidina y en azul los núcleos teñidos con DAPI.



Dr. Fernando González-Camacho (CNM)

1.4. LA INMUNOFLUORESCENCIA

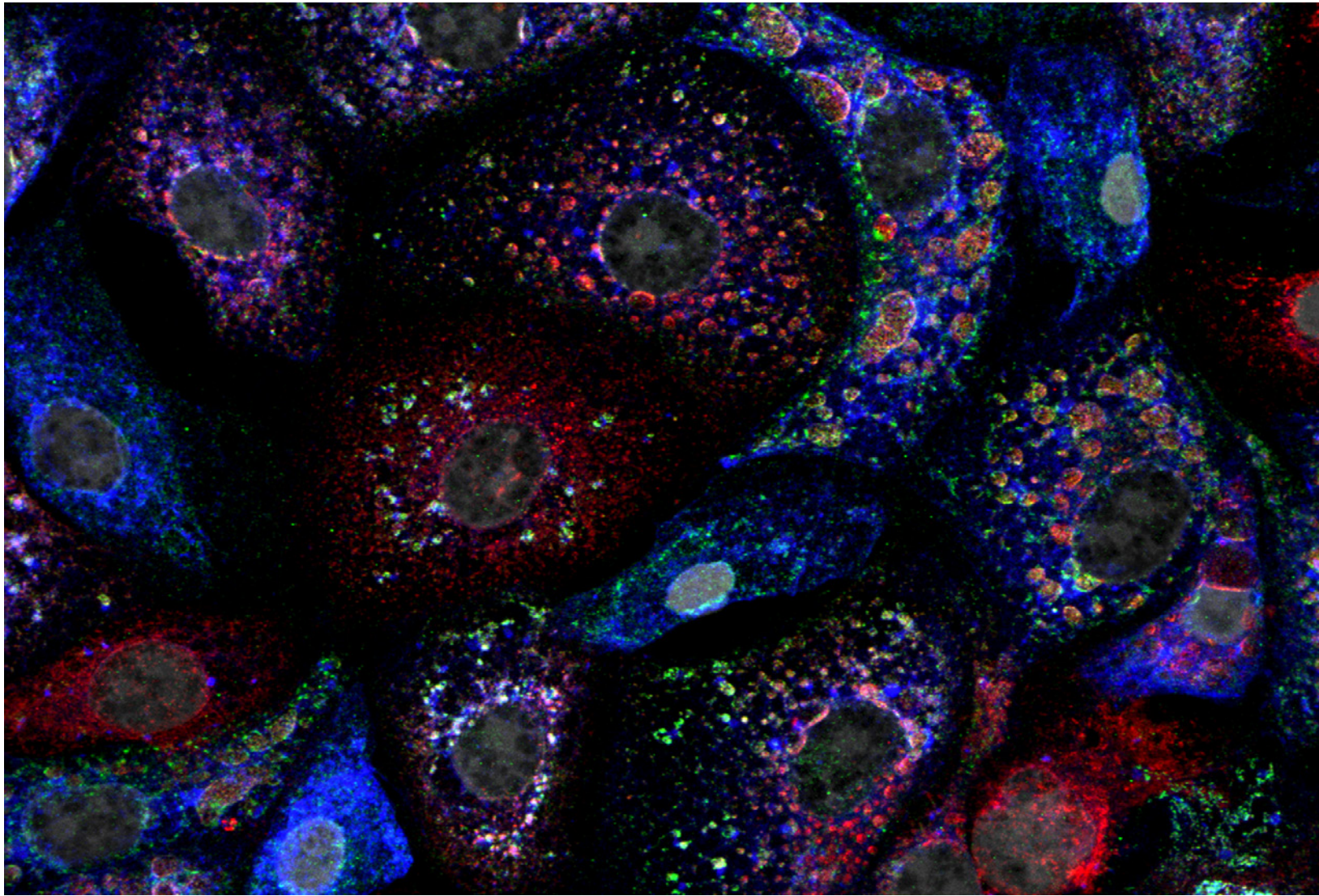
Gracias a la especificidad del reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo se han desarrollado una gran variedad de técnicas de diagnóstico e investigación. Una de estas técnicas es la inmunofluorescencia en la que una proteína es detectada mediante un anticuerpo específico. Este anticuerpo puede ir conjugado a un fluorocromo (inmunofluorescencia directa) o puede emplearse un segundo anticuerpo conjugado que reconoce al primero (inmunofluorescencia indirecta).

Debido a esta especificidad, se puede emplear de manera simultánea diferentes anticuerpos que reconozcan distintas proteínas dentro de la misma preparación, esto permite observar su distribución, interacción, colocalización, etc.

Además, en diagnóstico se puede emplear como técnica serológica para confirmar la presencia de determinados anticuerpos presentes en el propio suero del paciente.

Imagen 5: Triple inmunofluorescencia

Cultivo de células MA104 infectado con Rotavirus y fijado 6 horas post infección. En este experimento se realizó una triple inmunofluorescencia y un marcaje con un colorante para núcleos. En verde se muestra la proteína del virus NSP4 que se localiza con un anticuerpo anti-NSP4 de pollo; en rojo se marca la proteína marcadora de retículo PDI detectada con un anticuerpo primario de ratón; la proteína del virus VP2 se marca en cian y se detecta con un anticuerpo primario de cobaya. En gris se marcan los núcleos teñidos con DRAQ5 que emite fluorescencia en rojo lejano.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. Javier María Rodríguez y el Dr. Daniel Luque (CNM)

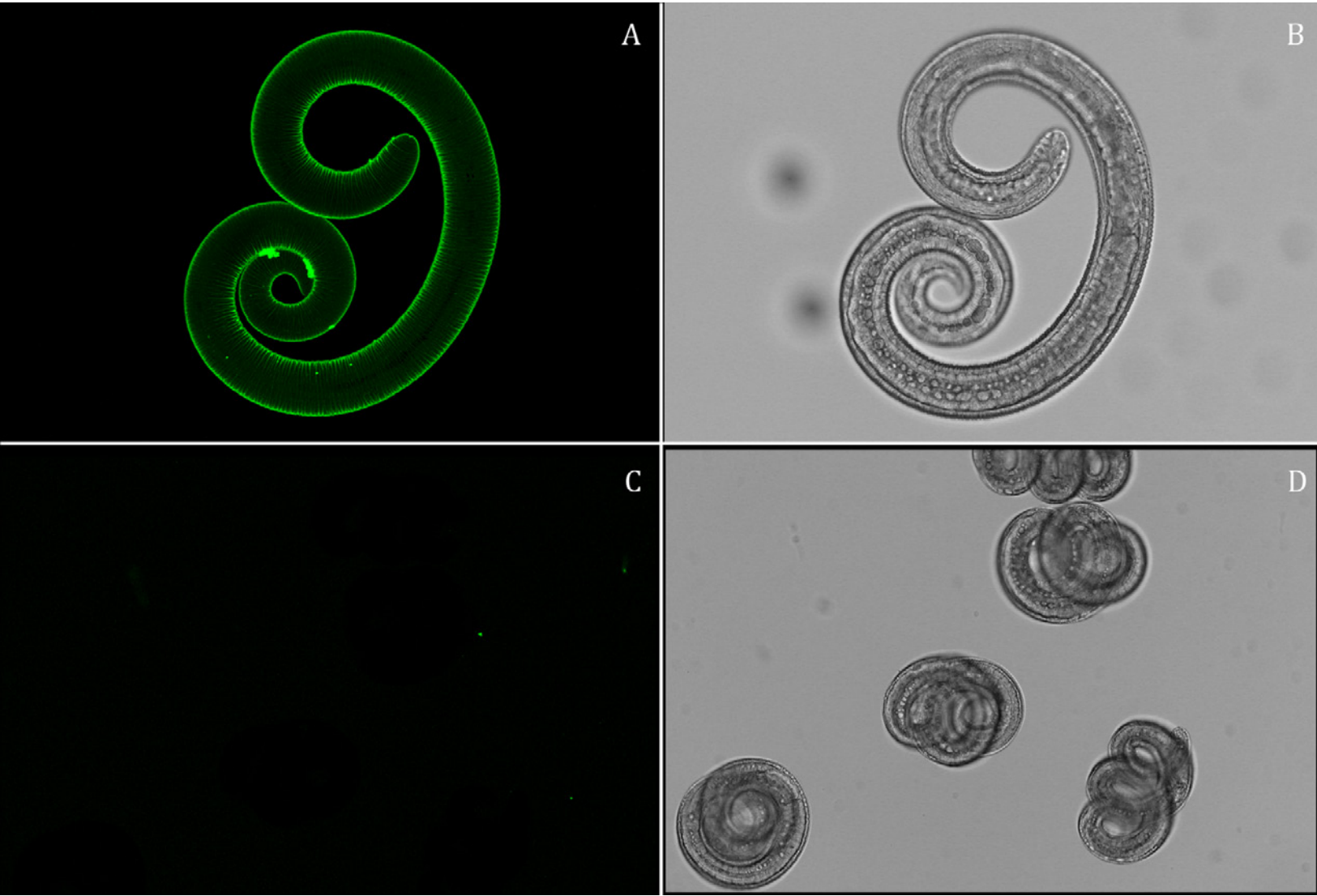
Imagen 6: Inmunofluorescencia indirecta en diagnóstico

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica ampliamente utilizada como herramienta de diagnóstico. Para saber si un paciente ha estado en contacto con un determinado patógeno, en este caso *Trichinella spiralis*, se realiza esta técnica basándose en el hecho de que un organismo, cuando entra en contacto con el patógeno, produce una serie de anticuerpos específicos contra dicho patógeno.

Los parásitos se mantienen en el modelo experimental murino y las larvas de *Trichinella spiralis*, aisladas mediante digestión clorhidropepsica, se utilizan como antígeno. Cuando se sospecha que un paciente está infectado, se toma una muestra de sangre y a partir del suero se realiza la determinación de anticuerpos específicos frente a *Trichinella* spp. por inmunofluorescencia. Los

parásitos se incuban con el suero del paciente y si ha estado en contacto con el patógeno, su suero tendrá anticuerpos que reconozcan al parásito. Los anticuerpos procedentes del paciente unidos al parásito son detectados mediante una segunda incubación con un anticuerpo comercial conjugado con un fluorocromo capaz de reconocer a los primeros. La observación se realiza posteriormente en el microscopio de fluorescencia.

A) Caso positivo de un paciente que presenta anticuerpos IgG frente a *Trichinella spiralis*, el anticuerpo secundario Anti-IgG humano está conjugado con un fluorocromo que emite fluorescencia en la franja verde del espectro de luz. **B)** Imagen en campo claro. **C)** Control negativo, en este caso se realizó la inmunofluorescencia con el suero de una persona que no presentaba anticuerpos contra este parásito. **D)** Imagen de campo claro.



Por cortesía de las doctoras Esperanza Rodríguez de las Parras y Sonsoles Jiménez Sánchez (CNM)

1.5. LA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Para detectar secuencias concretas dentro de ADN de una célula, tanto en interfase como en mitosis, se pueden emplear sondas de ADN con secuencias complementarias a éstas y marcadas fluorescentemente. Mediante cambios en la temperatura y los medios apropiados, se favorece la hibridación de la secuencia concreta del genoma con nuestra sonda marcada, esto permite localizarla dentro del contexto citológico.

Esta técnica está ampliamente extendida en el estudio de mutaciones, tanto en diagnóstico como en investigación, como duplicaciones, translocaciones, deleciones, etc. Una variante es el FISH multicolor, en el que se emplea un kit de sondas multicolor que permite teñir cada uno de los cromosomas de un color diferente, es el Sky (Spectral Karyotyping) capaz de distinguir cada uno de los colores mediante el empleo de la transformada de Fourier.

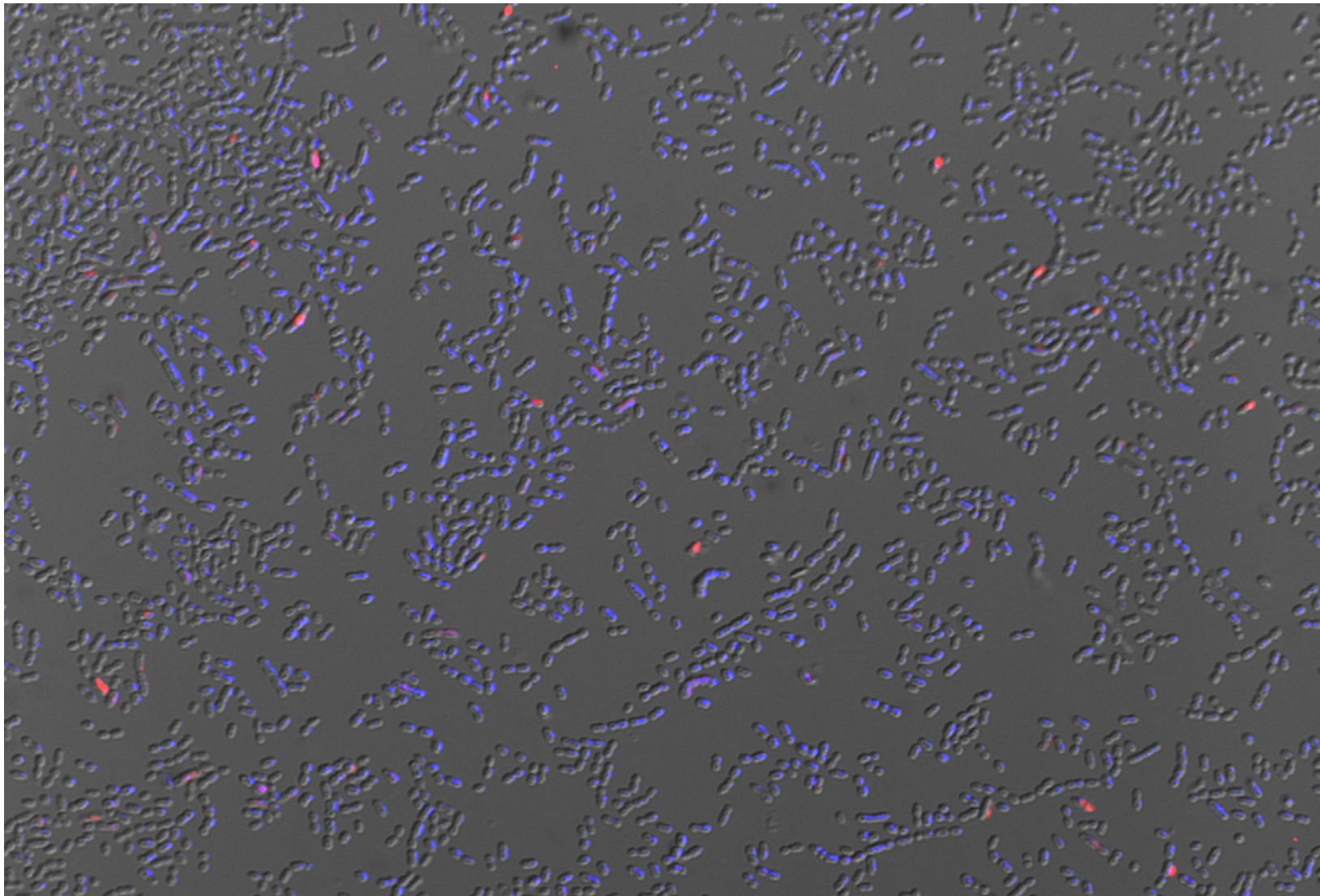
En microbiología esta técnica se emplea para la identificación de procariotas. Lo más habitual es la utilización

de sondas de oligonucleótidos que tienen como diana el RNA ribosómico (rRNA), con el fluorocromo unido covalentemente por su extremo 5'. En otros casos la sonda complementaria se puede diseñar para que reconozca determinados RNA mensajeros (mRNA) o incluso tmRNA que es un pequeño RNA no codificante bifuncional con características de tRNA y de mRNA. También se ha empleado en la identificación de microorganismos en muestras ambientales y en cultivos de sangre.

Imagen 7: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en *Streptococcus pneumoniae*

Hibridación *in situ* con una sonda de hibridación diseñada para que anille con el tmRNA, esta sonda está conjugada con el fluorocromo cianina 3 (Cy3).

La hibridación se muestra en rojo, en azul está teñido en ADN bacteriano mediante DAPI; las bacterias se observan mediante la técnica de luz transmitida Nomarski. El objetivo empleado es el plan apocromático 63x aplicando un zoom óptico de 2x.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con la Dra. Mónica Amblar y Paloma Acebo (CNM)

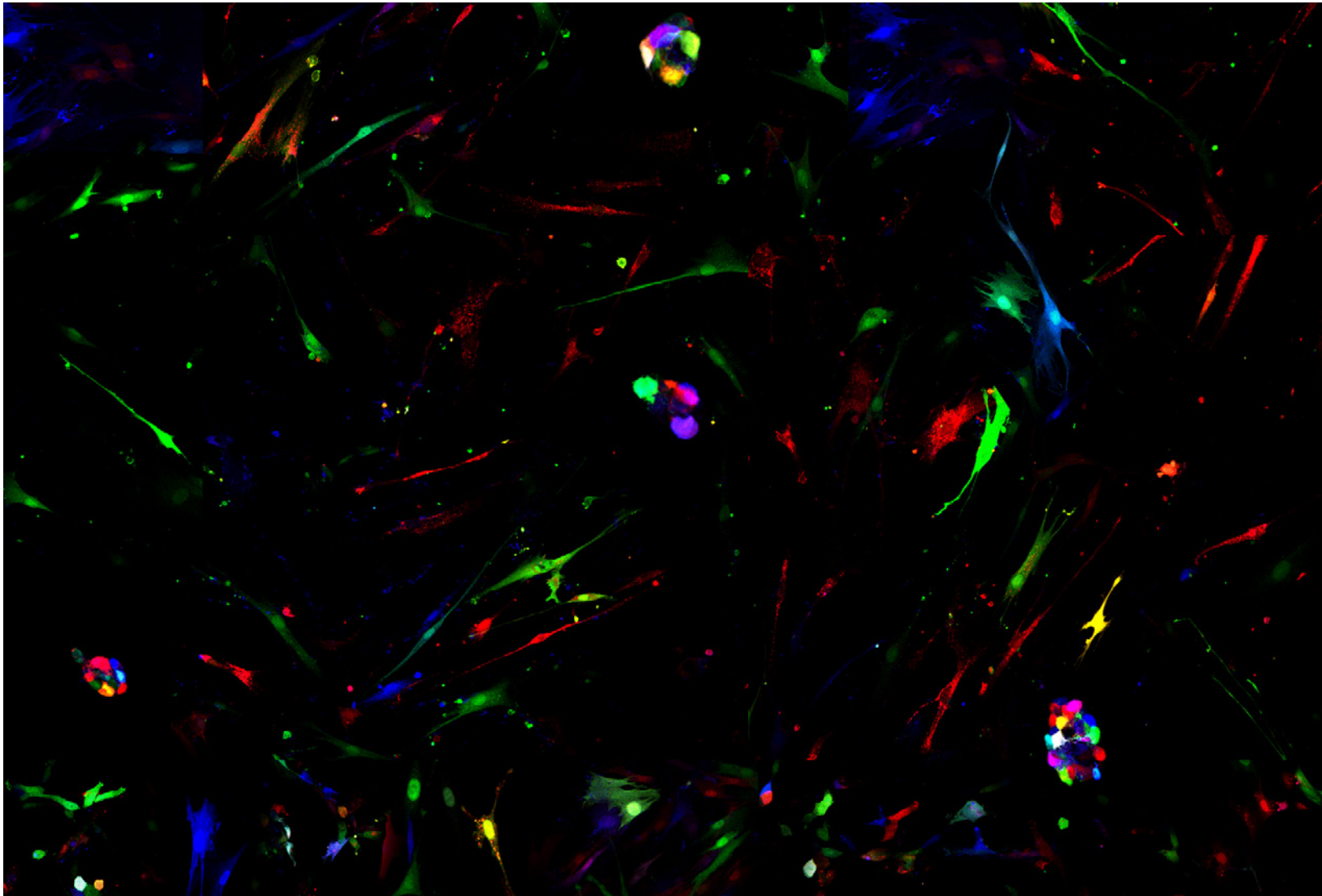
Imagen 8: Fluorescencia mediante la combinación del sistema RGB

Cuando los fluorocromos Cerulean, Venus y mCherry se emplean juntos, al conjunto se le conoce como sistema RGB por combinarse los fluorocromos que emiten en rojo (Red), verde (Green) y azul (Blue).

En esta imagen podemos observar un cultivo celular transducido con Lentivirus. Se empararon simultáneamente tres poblaciones diferentes de virus que codifican cada una de estas poblaciones para una de las proteínas fluorescentes, así

tendremos una población verde, una roja y otra azul. Estos genes se integran en el genoma celular y mediante procesos de recombinación y por la introducción de diferentes números de copias de los genes de las diferentes poblaciones de virus se obtiene un resultado asombroso, pudiendo tener cada célula individual con un color distinto y único.

Esta técnica permite la observación de células individuales en el contexto del organismo entero, algunas de sus aplicaciones es el estudio de las conexiones intercelulares, migración celular, desarrollo o en crecimientos de tumores.



Por cortesía de la Dra. Arantazu Alfranca, el Dr. Javier García Castro y Vanesa Blanca (IIER)

CAPÍTULO 2. LOS CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares son una herramienta básica en biomedicina, tanto en el campo del diagnóstico como en la investigación. Se trata de un conjunto de técnicas encaminadas a mantener a las células favoreciendo su proliferación *in vitro* en un medio artificial manteniendo sus propiedades fisiológicas y genéticas. El empleo de cultivos celulares, en lugar de organismos vivos (experimentos *in vivo*), aporta una serie de ventajas, como son: permiten un control preciso del medio ambiente, aportan homogeneidad a la muestra, es más económico y solucionan la controversia ética de la experimentación animal. La mayor desventaja que presentan es que, al tratarse de experimentos *in vitro*, los resultados obtenidos pueden alejarse de lo que sucede en un organismo.

Los cultivos celulares difieren del tejido del que proceden. Se ha perdido la organización espacial tridimensional, se pierde las interacciones entre los distintos tipos celulares que forman parte de un tejido, así como entre las células y la matriz extracelular. También carecen de los componentes sistémicos que regulan la homeostasis del organismo, tales como el sistema nervioso y el sistema endocrino. Todos estos factores conllevan a que se tengan que hacer ensayos para contrastar y validar los resultados en modelos *in vivo*.

Algunos de los campos en los que se emplean los cultivos celulares son: en el estudio de posibles interacciones entre

proteínas intracelulares, interacción entre células o patógenos, los efectos de ciertos estímulos o compuestos. Los estudios con cultivos celulares suponen una primera aproximación, previa a los estudios con organismos vivos.

Las células que se obtienen en suspensión, en ocasiones se cultivan en este estado, pero normalmente necesitan un soporte sobre el que crecer y multiplicarse, que suele ser una superficie sólida, placa o flash de plástico, sobre la que forman una monocapa.

La aparición de medios de cultivo, el uso de antibióticos y la suplementación del medio con sueros, han permitido el desarrollo y mejora de los cultivos de células animales.

La experimentación con células en cultivo requiere una serie de condiciones para su óptima realización, como son: 1. El mantenimiento de un entorno aséptico, libre de microorganismos infecciosos, se consigue con el empleo de cabinas de flujo laminar que garantizan la esterilidad en la zona de trabajo; 2. El control de una temperatura apropiada (37°) y atmósfera de CO₂ (5%); 3. y una adecuada criopreservación para almacenar un stock de células durante largos periodos de tiempo con la posibilidad de emplearlas con posterioridad.

Uno de los problemas más frecuentes en el cultivo celular es, el de las contaminaciones por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Éstas, pueden destruir el cultivo o alterar sus propiedades. En algunos casos, no se observa directamente al microscopio, por lo que es importante realizar controles periódicos que puedan determinar su presencia.

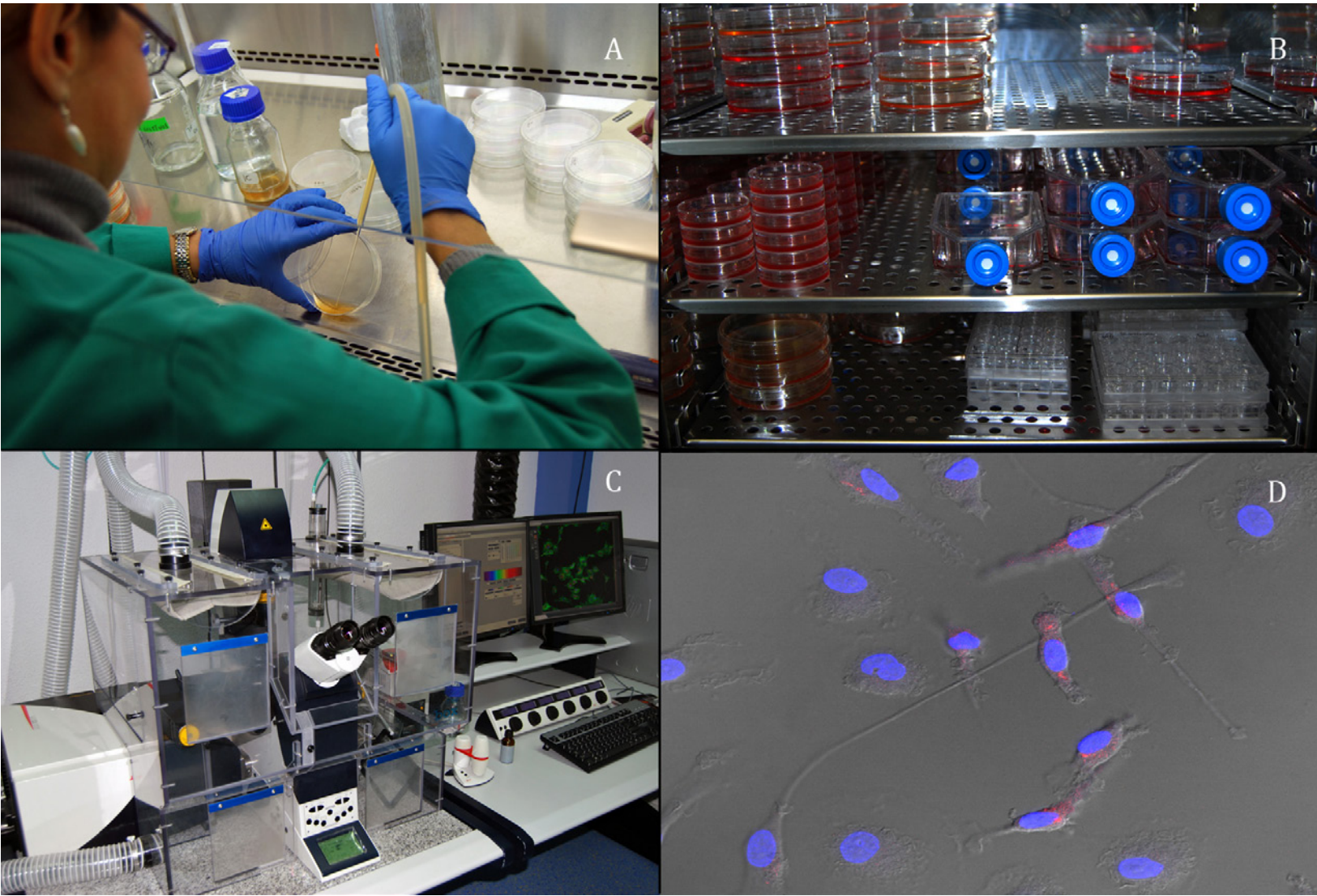
En el instante en que las células comienzan a dividirse en la placa, su número se incrementa hasta expandirse, formando una monocapa, momento en el que muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos (confluencia 80-90%). En este momento, se recomienda resebrar en una nueva placa de mayores dimensiones, o diluir las células (hacer «pases») en caso de pasarlas a placas del mismo tamaño. Tras superar un número determinado de pases, las células entran en una fase de senescencia, con acumulación de numerosas anomalías y

pérdida de algunas funciones que conducen a la muerte del cultivo.

Imagen 9: El cultivo de células

Se trata de un conjunto de técnicas encaminadas a mantener viva una población celular sobre las que luego se realizará un experimento. Son la base experimental en investigación biomédica. A estas células se las tiene que alimentar, procurarles las condiciones ambientales apropiadas (temperatura, oxígeno, pH) y mantener una gran esterilidad para que no se contaminen. El instrumento básico para observarlas es el microscopio óptico.

A: Cabina de cultivos celulares que garantizan la esterilidad; **B:** Estufa de cultivos; **C:** Microscopio confocal equipado con sistema de incubación para experimentos *in vivo*; **D:** cultivo celular fijado y teñido.



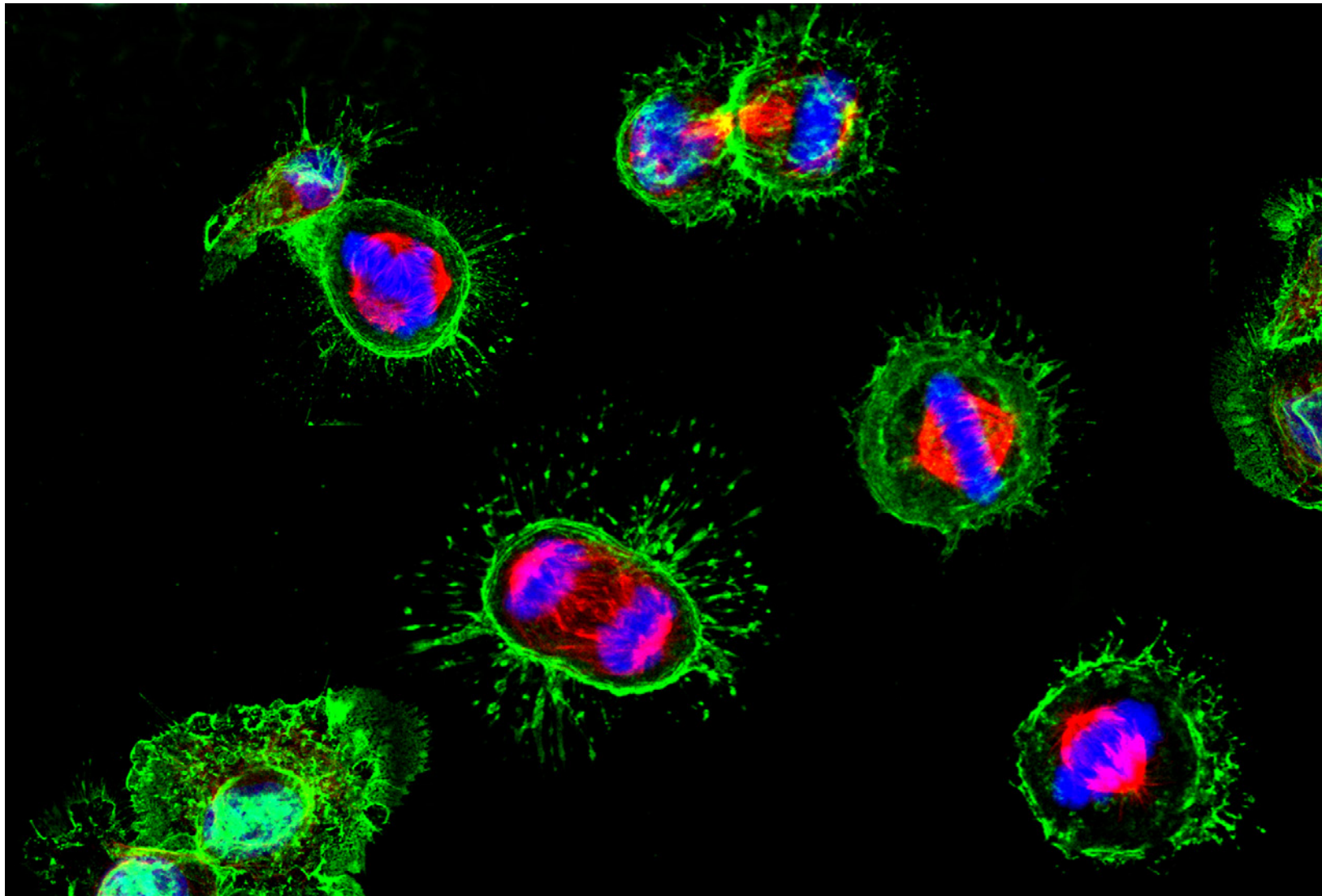
Con la colaboración de la Dra. Sonsoles Hortelano, Dr. Javier García Castro y Dra. Isabel Mirones (IIER)

Imagen 10: La mitosis

La mitosis es el proceso por el cual las células duplican su ADN para posteriormente dividirlo y repartirlo por igual, la célula se divide dando dos células hijas idénticas. En células en cultivo es frecuente observar deficiencias en

este proceso de división produciéndose anomalías genéticas.

Cultivo de células HeLa en división. En azul están teñidos los cromosomas con DAPI, en rojo el citoesqueleto de microtúbulos, en verde la proteína p75.



Por cortesía del Dr. Marçal Vilar (UFIEC)

2.1. LOS CULTIVOS CELULARES, UN PILAR EN LA INVESTIGACIÓN

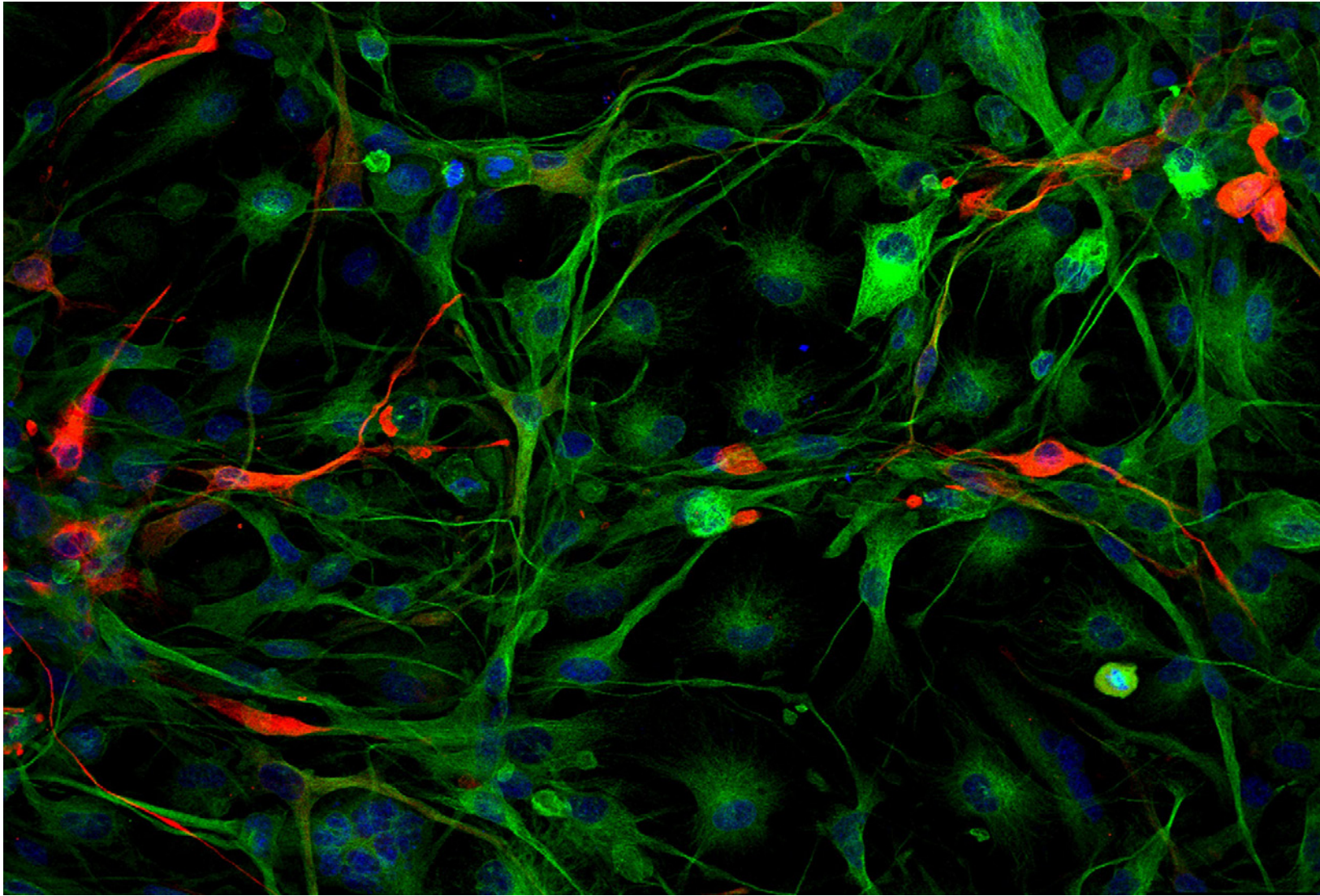
Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la aplicada. Las áreas en la investigación básica en las que los cultivos celulares son imprescindibles se centran fundamentalmente en la actividad intracelular y en la interacción con su entorno, tales como transcripción de ADN, síntesis de proteínas, metabolismo energético, señalización, apoptosis, ciclo celular, flujo intracelular de macromoléculas, transformación celular, morfogénesis, proliferación celular, adhesión, estudios de interacción huésped patógeno etc.

En la investigación aplicada, los cultivos celulares se emplean en multitud de áreas, como son: en virología para el cultivo de los propios virus y la producción de vacunas antivirales. En biotecnología para la producción industrial de

fármacos en biorreactores, tales como insulina e interferón. En inmunología para la producción de anticuerpos monoclonales gracias a las técnicas de fusión celular, y en estudios de fenómenos de inflamación. En farmacología para el estudio de los efectos de fármacos, interacciones con el receptor y fenómenos de resistencia. En ingeniería de tejidos para la producción artificial de tejidos en injertos y autotransplantes. En toxicología en estudios de citotoxicidad, carcinogénesis y dosis-respuesta. En los ensayos preclínicos de nuevos fármacos.

Imagen 11: Cultivo celular primario de células de glioblastoma

Cultivo de células de glioblastoma procedente de una biopsia de paciente. Se marcan en verde la proteína tuj y en rojo se marca el GFAP. Al tratarse de células tumorales, han perdido la inhibición por contacto por lo que dejan de crecer en monocapa.



Por cortesía de la Dra. Pilar Sánchez y la Dra. Cristina Zahonero (UFIEC)

2.2. LOS CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

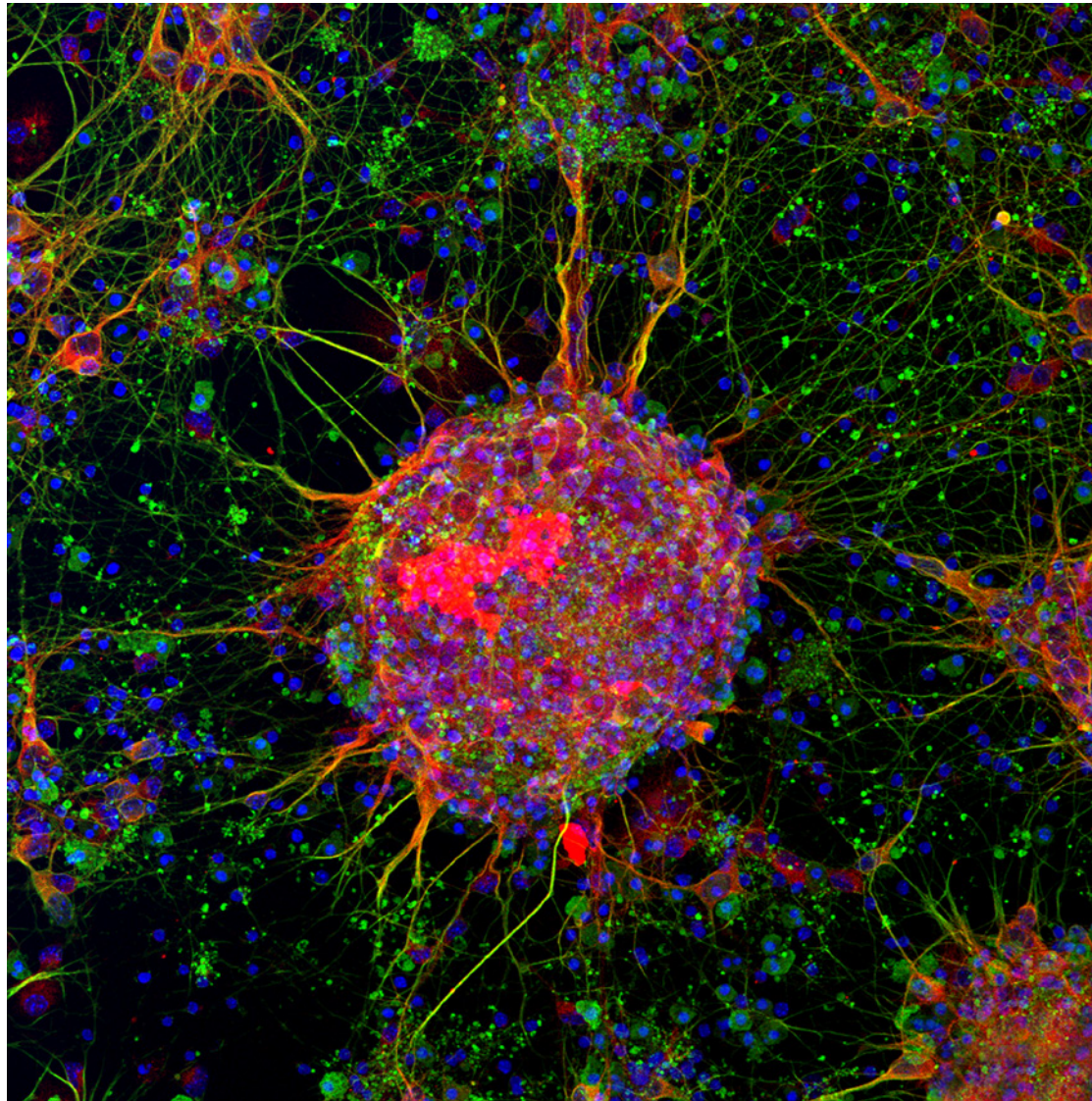
Los cultivos primarios son aquellas células que provienen directamente de un organismo vivo, al cual se le extrae una muestra de tejido (biopsia), de un órgano o de fluidos biológicos. Las muestras que proceden de órganos o tejidos, primero se fragmentan de manera mecánica y posteriormente se realiza una digestión con enzimas para conseguir obtener células aisladas que serán cultivadas.

Son dos los tipos de cultivos primarios, por un lado están los que crecen adheridos a la placa, generalmente presentan inhibición por contacto y forman una monocapa de células, como es el caso de las células epiteliales y los fibroblastos. El segundo tipo de cultivo celular son los que crecen en suspensión, flotando en el propio medio de cultivo, como son los monocitos y los linfocitos.

Estos cultivos tienen una serie de características que los diferencian de las líneas celulares, algunas de estas características son que conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, *in vitro* presentan un crecimiento limitado y son diploides ($2n$). Por ello el cultivo primario tiene como ventajas: tener una mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida por ser más cercanas a las células que la originaron, y una baja probabilidad de que las células se transformen en malignas.

Imagen 12: Cultivo de neuronas

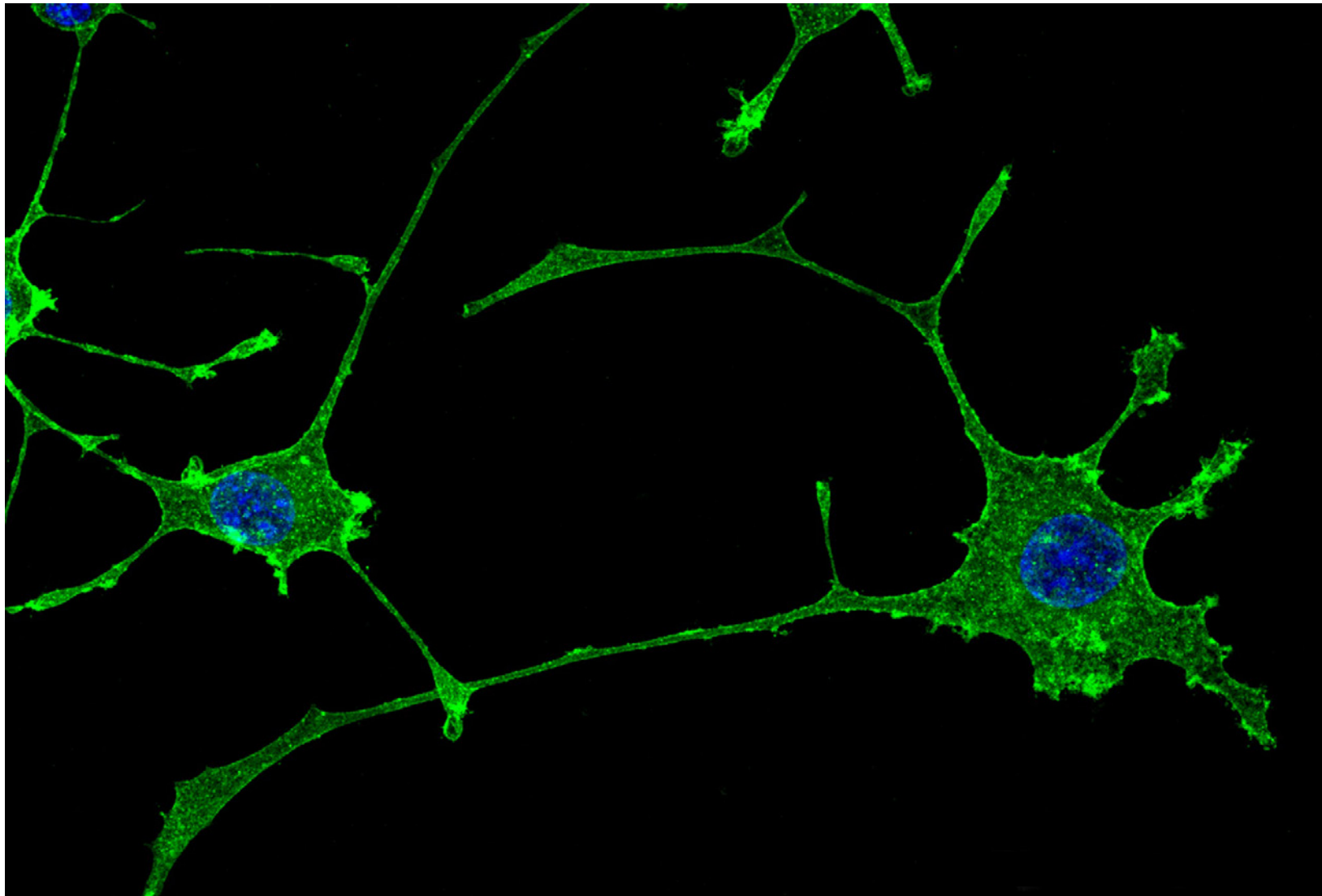
Cultivo primario de corteza cerebral de ratón. En verde se marca la β III tubulina (neuronas), en rojo la proteína precursora amiloide (APP), en azul los núcleos.



Por cortesía de la Dra. Isabel Liste Noya y Dra. Patricia Martínez-Morales (UFIEC)

Imagen 13: Cultivo de neuronas

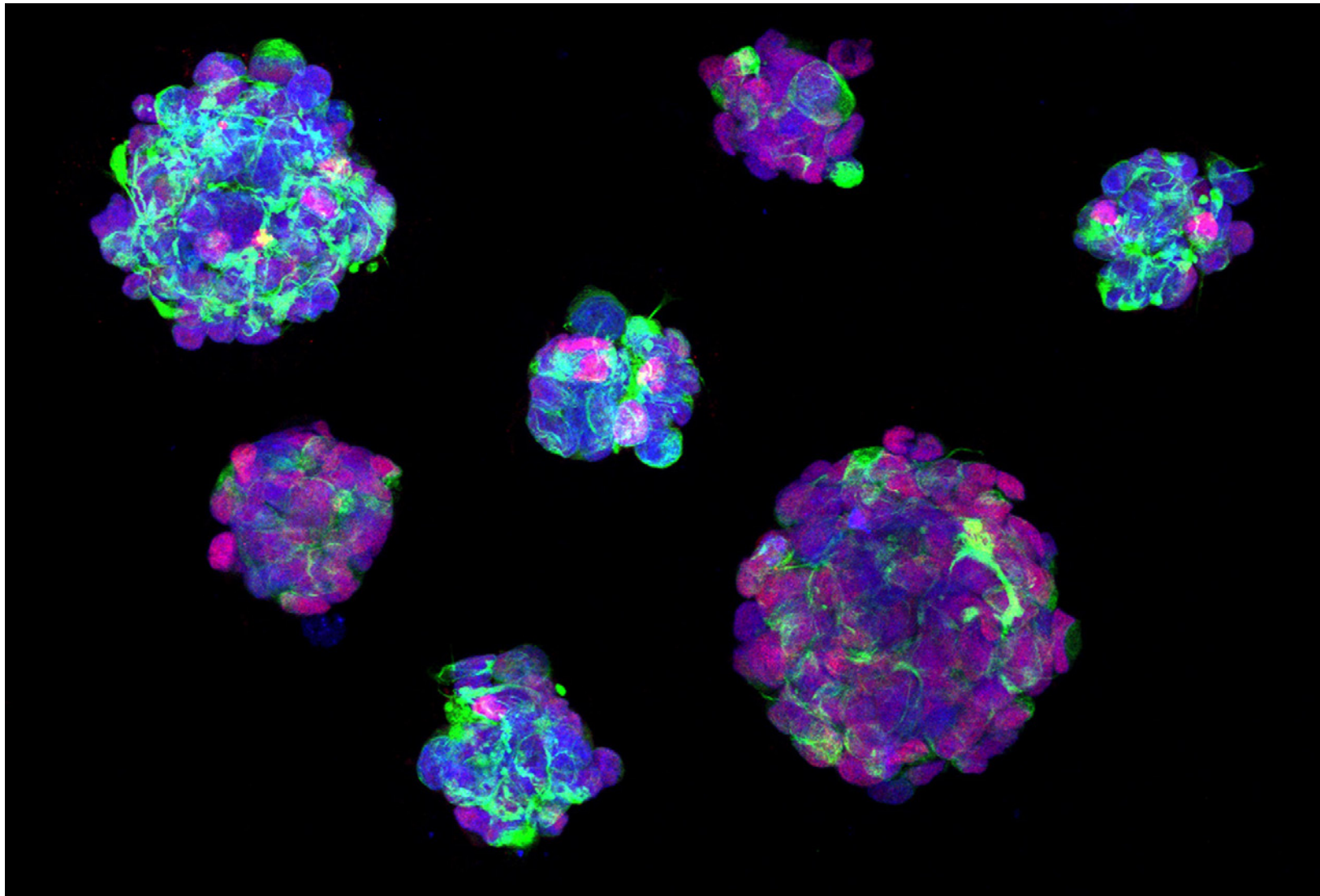
En verde, detección de la proteína p75 mediante un anticuerpo específico.



Por cortesía del Dr. Marçal Vilar y Sergio Hernández Latorre (UFIEC)

Imagen 14: Neuroesferas

Células tumorales en cultivo formando neuroesferas.



Por cortesía de la Dra. Pilar Sánchez y la Dra. Cristina Zahonero (UFIEC)

2.3. LAS LÍNEAS CELULARES

Una línea celular es un cultivo celular continuo que tiene una elevada capacidad de multiplicarse *in vitro*. Las líneas celulares provienen del primer subcultivo de un cultivo primario, el paso de un cultivo primario a una línea celular se denomina transformación.

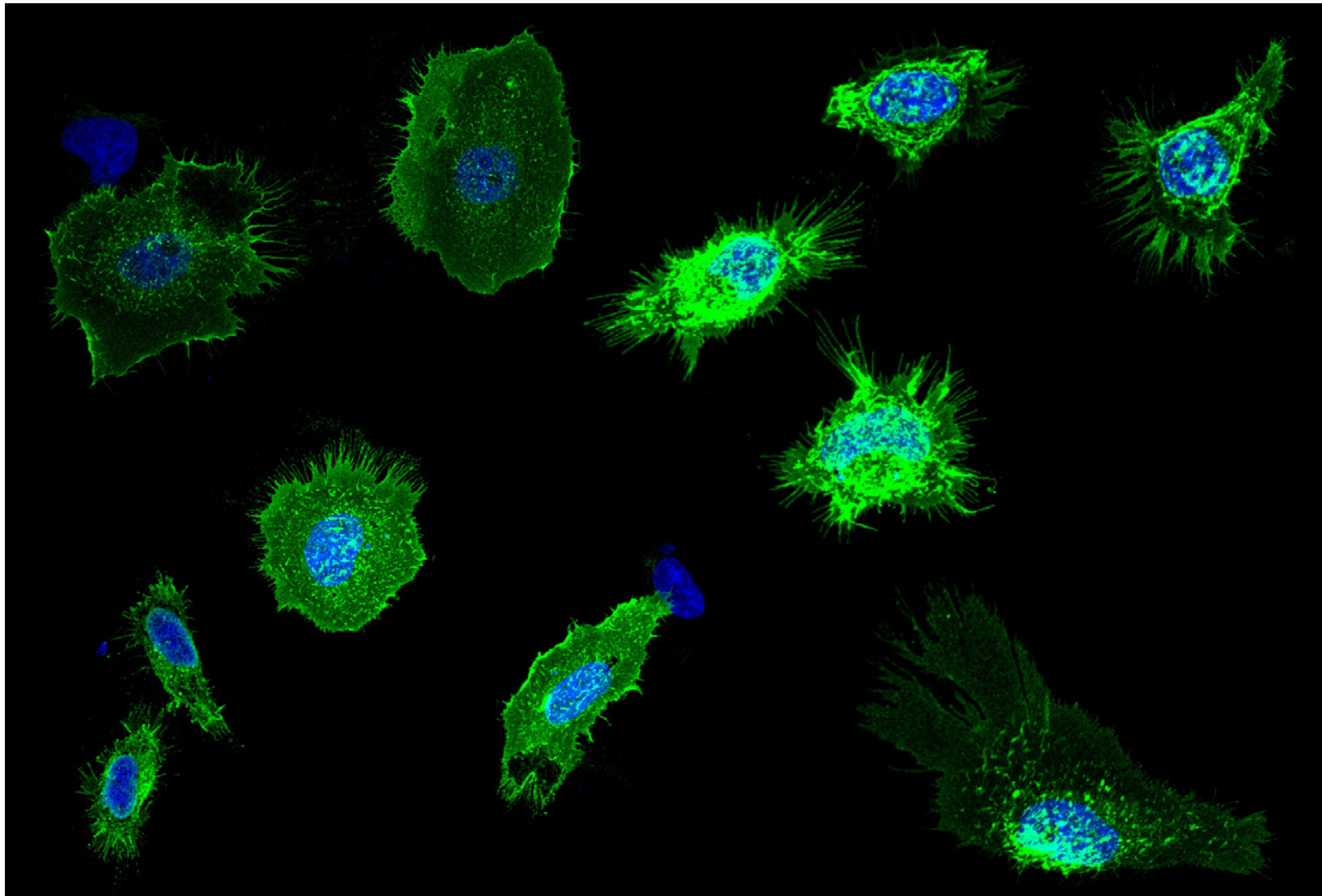
Algunas de las propiedades que las caracterizan son que tienen una capacidad ilimitada de multiplicación y crecen de manera indefinida, presentan alteraciones cromosómicas (aneuploidías), presentan cambios morfológicos y diferencias genéticas respecto a las células que les dieron origen, y son células derivadas de tumores o transformadas de cultivos primarios mediante oncogenes o por mecanismos carcinógenos, a este fenómeno se le denomina transformación y se caracterizan por no presentar inhibición por contacto.

Las líneas celulares son muy útiles en ensayos *in vitro*, como fuente de un gran número de células semejantes, que pueden ser conservadas y almacenadas por un largo período de tiempo, manteniendo su viabilidad, y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de la investigación.

Algunas de las líneas celulares más utilizadas en investigación son: células HeLa: adenocarcinoma de cérvix uterino humano; células COS: hígado de mono; NIH 3T3: Fibroblastos embrionarios de ratón; células Vero: células epiteliales de riñón de mono verde Africano.

Imagen 15: Células HeLa

Cultivo de células HeLa, en verde la proteína p75, en azul los núcleos.



Por cortesía del Dr. Marçal Vilar (UFIEC)

CAPÍTULO 3. LOS COMPONENTES CELULARES

Una de las grandes ventajas de la microscopia es la posibilidad que nos brinda para por ver lo que sucede en el interior de los tejidos o de las células. Pero muchas veces no es suficiente ver la célula en sí, necesitamos distinguir y delimitar el lugar subcelular donde ocurren los procesos que estamos estudiando, o visualizar los propios cambios que pueden sufrir los componentes celulares. Para ello nos servimos de tinciones específicas para los distintos orgánulos o componentes subcelulares.

En microbiología una de las tinciones fluorescentes más comunes es el calcoflúor, especialmente en el estudio y diagnóstico de hongos, levaduras y parásitos debido a que este compuesto tiñe las paredes celulares de quitina y la celulosa, compuestos éstos ausentes en mamíferos. Este compuesto se excita con luz ultravioleta y emite luz azul.

3.1. EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es una estructura tridimensional que le sirve de sostén a la célula, pero es dinámico, y esta propiedad le confiere unas funciones adicionales. En eucariotas, existen tres componentes distintos, los microfilamentos o filamentos de actina, microtúbulos o filamentos de tubulina y los filamentos intermedios.

Una infección por micoplasmas puede conducir a una reorganización del citoesqueleto.

Los filamentos de actina

Los filamentos de actina participan en varias funciones celulares, como la citocinesis, participan en la forma de las microvellosidades, y en la formación de fibras de estrés que se producen en las células cuando estas son sometidas a presión o roce mecánico.

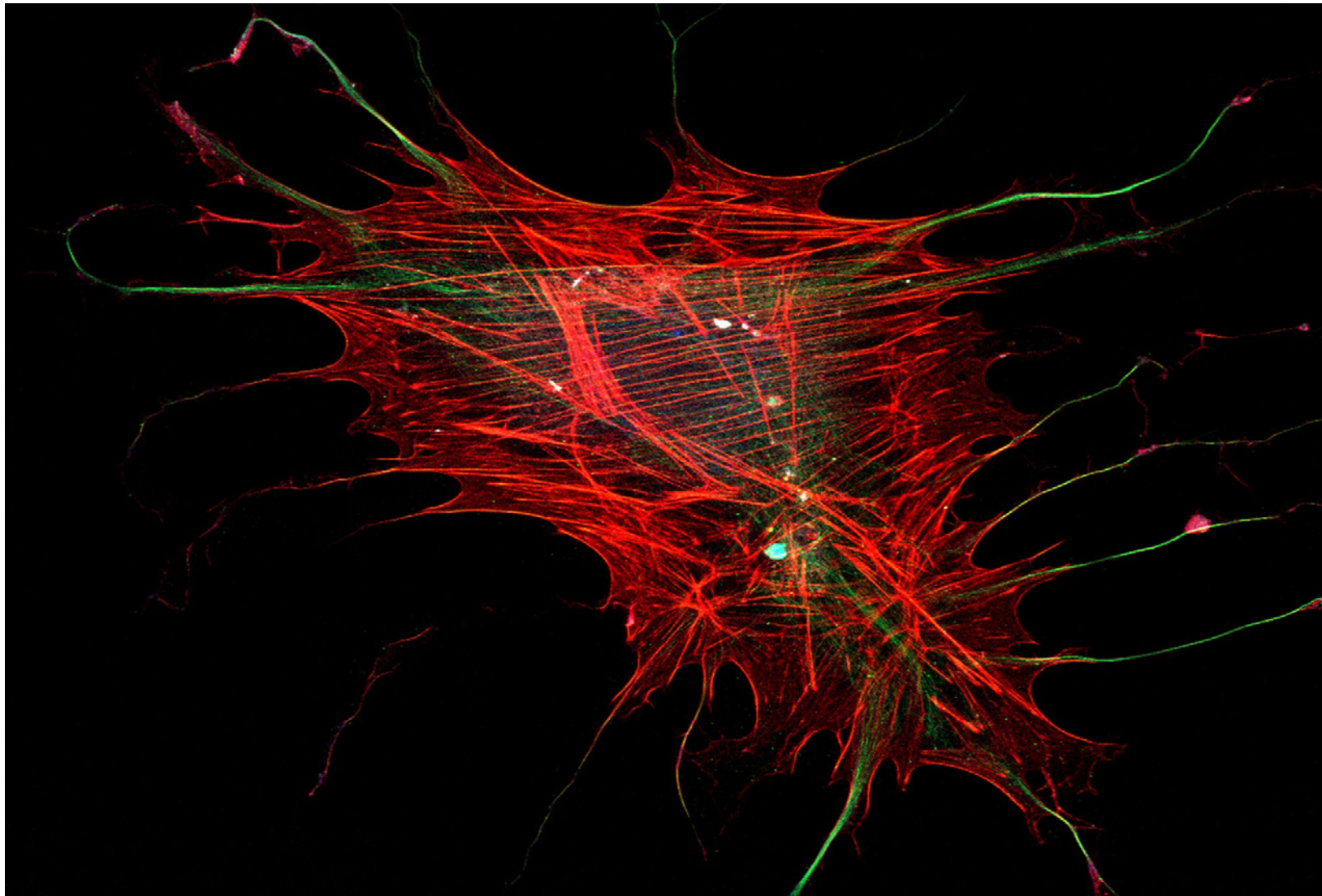
Una de las maneras más habituales de observar el citoesqueleto de actina es mediante el empleo de faloidina. Este compuesto es un potente tóxico presente en la *Amanita phalloides* que se une a los filamentos de actina (actina F) de manera irreversible dándoles una gran estabilidad e impidiendo su despolarización e inhibiendo su dinamismo. La faloidina se comercializa conjugada a diferentes fluorocromos como el FITC o el TRITC.

Los métodos convencionales para la fijación y posterior observación de cultivos celulares mediante fluorescencia se basan en el empleo de formaldehído preparado a partir de paraformaldehído o como alternativa, la fijación con metanol.

Para la observación de las fibras de actina, no se podría emplear el metanol porque interfiera en la propia estructura de las fibras.

Imagen 16: Citoesqueleto de actina

Fibras de actina formando parte del citoesqueleto.



Por cortesía del Dr. Miguel Calero y la Dra. Alejandra Kun (UFIEC)

Los microtúbulos

Los microtúbulos son un componente esencial del citoesqueleto, participan en la forma celular, juegan un papel fundamental en la distribución interna de los componentes celulares, también participan en la división celular mediante la formación del huso mitótico y en algunos casos intervienen en el desplazamiento celular debido a que forman parte de los cilios y flagelos. Los microtúbulos están formados por dímeros de α - β tubulina, en eucariotas existe un tercer tipo de tubulina, la γ tubulina.

A diferencia de lo que sucede con la actina, los microtúbulos no se ven afectados por la fijación con metanol y la manera tradicional de detectarlos es mediante una inmunofluorescencia.

Filamentos intermedios

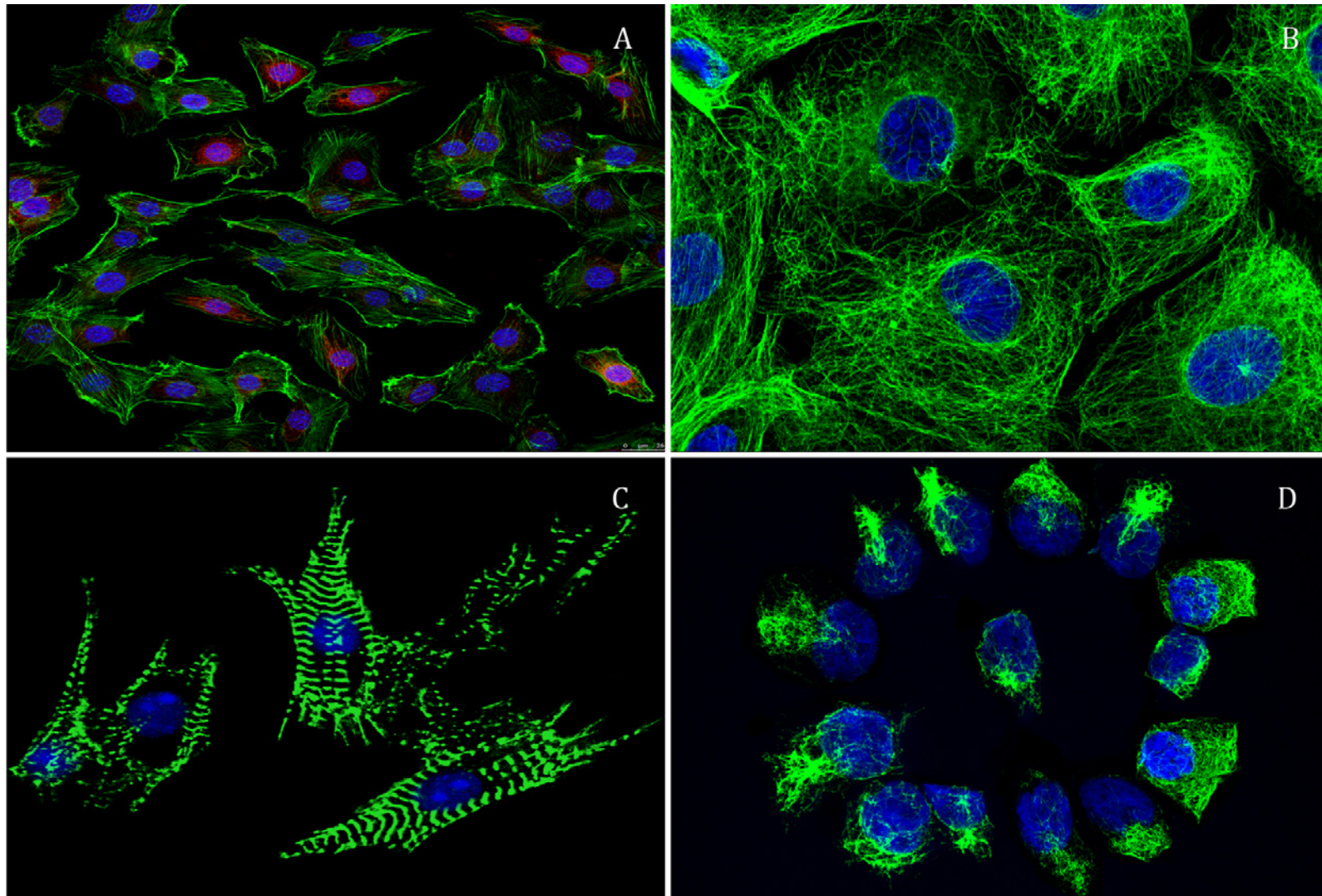
Algunos de los filamentos intermedios son las queratinas, la vimentina, la nestina, los neurofilamentos y la lámina nuclear.

La lámina nuclear, es una red de proteínas constituida por tres láminas, A, B y C, estos filamentos intermedios se localizan en la periferia del nucleoplasma.

La lámina nuclear confiere estabilidad mecánica a la envoltura nuclear participando en su organización tridimensional. Conecta con las proteínas de la membrana nuclear interna, interactúa con la cromatina y conecta con el complejo de poro nuclear (anillo nucleosómico) donde se interrumpe.

Imagen 17: El citoesqueleto

A: Cultivo de células NIH-3T3, en verde se detecta la F-actina mediante el empleo de faloidina-FITC, en rojo se detecta la proteína sur-8 y en azul los núcleos mediante la tinción con DAPI. **B:** Cultivo de células MA104, en verde se detecta la red de microtúbulos (α tubulina), los núcleos se tiñen en azul. **C:** Cultivo de células del músculo cardíaco, en verde se tiñe la α actina. **D:** Filamentos intermedios de vimentina.



A: Por cortesía del Dr. José María Rojas y la Dra. Carlota García Domínguez (UFIEC); B: Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. Javier María Rodríguez y el Dr. Daniel Luque (CNM); C: Dr. Fernando González-Camacho; D: Por cortesía del Dr. Javier Alonso y la Dra. Florencia Cidre (IIER)

3.2. LOS LÍPIDOS

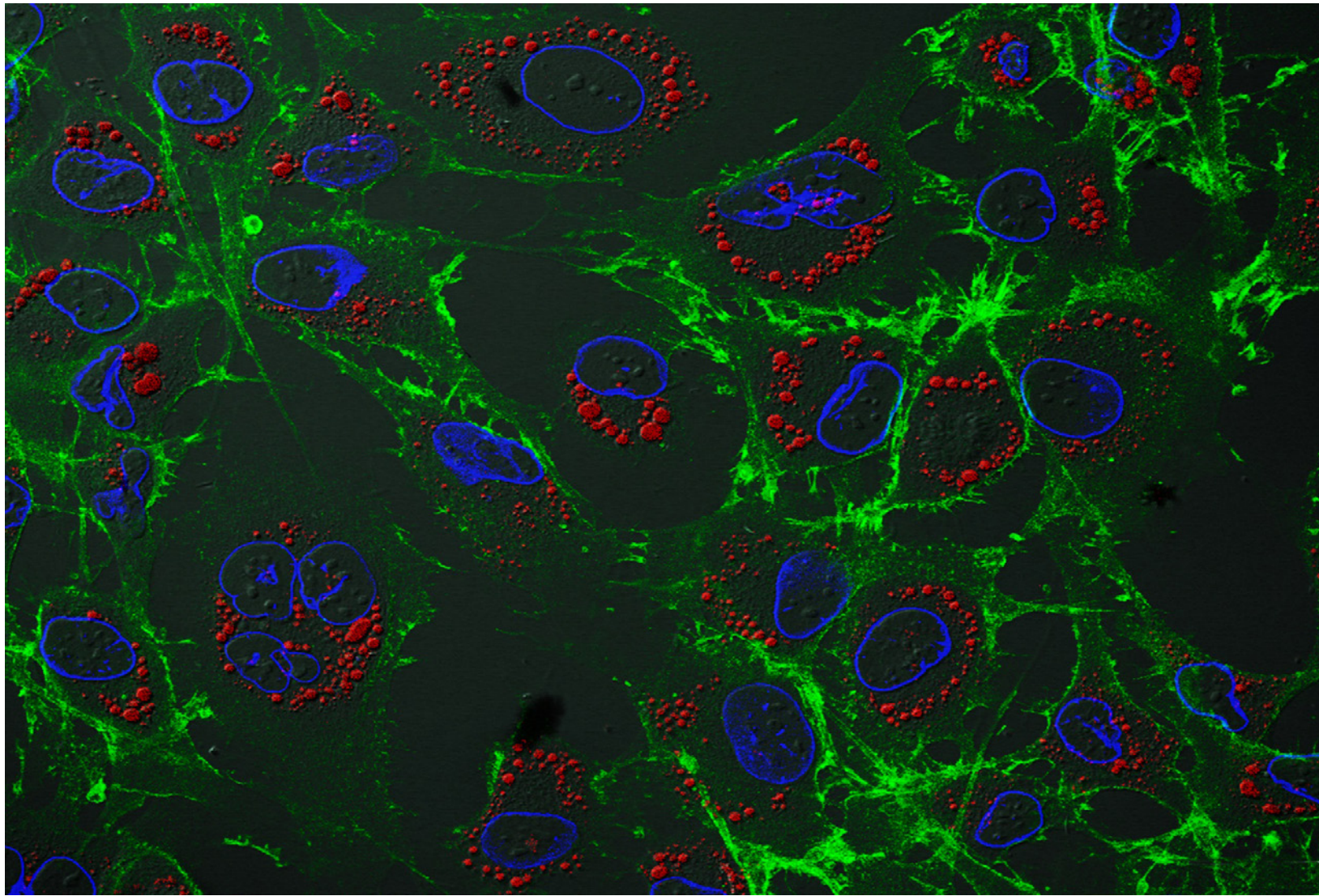
Los lípidos están implicados en muchas funciones celulares y cada vez es mayor el número de estudios que se centran en ellos. Poco a poco van surgiendo nuevos marcadores que pueden ayudar en estos estudios, bien para conseguir su trazabilidad en experimentos *in vivo*, bien para detectarlos en muestras fijadas.

Existen marcadores lipídicos que se unen a la membrana de células y tejidos vivos y se emplean como trazador neuronal, estudios de fusión celular, difusión lipídica en la membrana, marcadores de lipoproteínas, algunos de estos compuestos son el DiL y el DiO. En las membranas existen unos pequeños

dominios, claves en muchos procesos de señalización, son conocidos como balsas lipídicas (lipid rafts) y se pueden marcar gracias a la subunidad B de la toxina colérica, que se comercializa conjugada a diferentes fluorocromos como FITC o Alexa Fluor 594. Otro compuesto habitual en el marcaje de lípidos, es el Oil Red, en este caso lo que se marcan son gotas lipídicas localizadas en el interior celular (lipid droplets).

Imagen 18: Lípidos y lámina B

Línea celular de melanoma. En rojo los lípidos teñidos con Oil Red, en azul el citoesqueleto de filamentos intermedios de la lámina nuclear (específicamente, la lámina b). En verde la proteína β -catenina, implicada en la adhesión celular.



Por cortesía de la Dra. Ana Chocarro-Calvo (Universidad Rey Juan Carlos) y el Dr. Antonio de la Vieja (UFIEC)

3.3. EL APARATO DE GOLGI

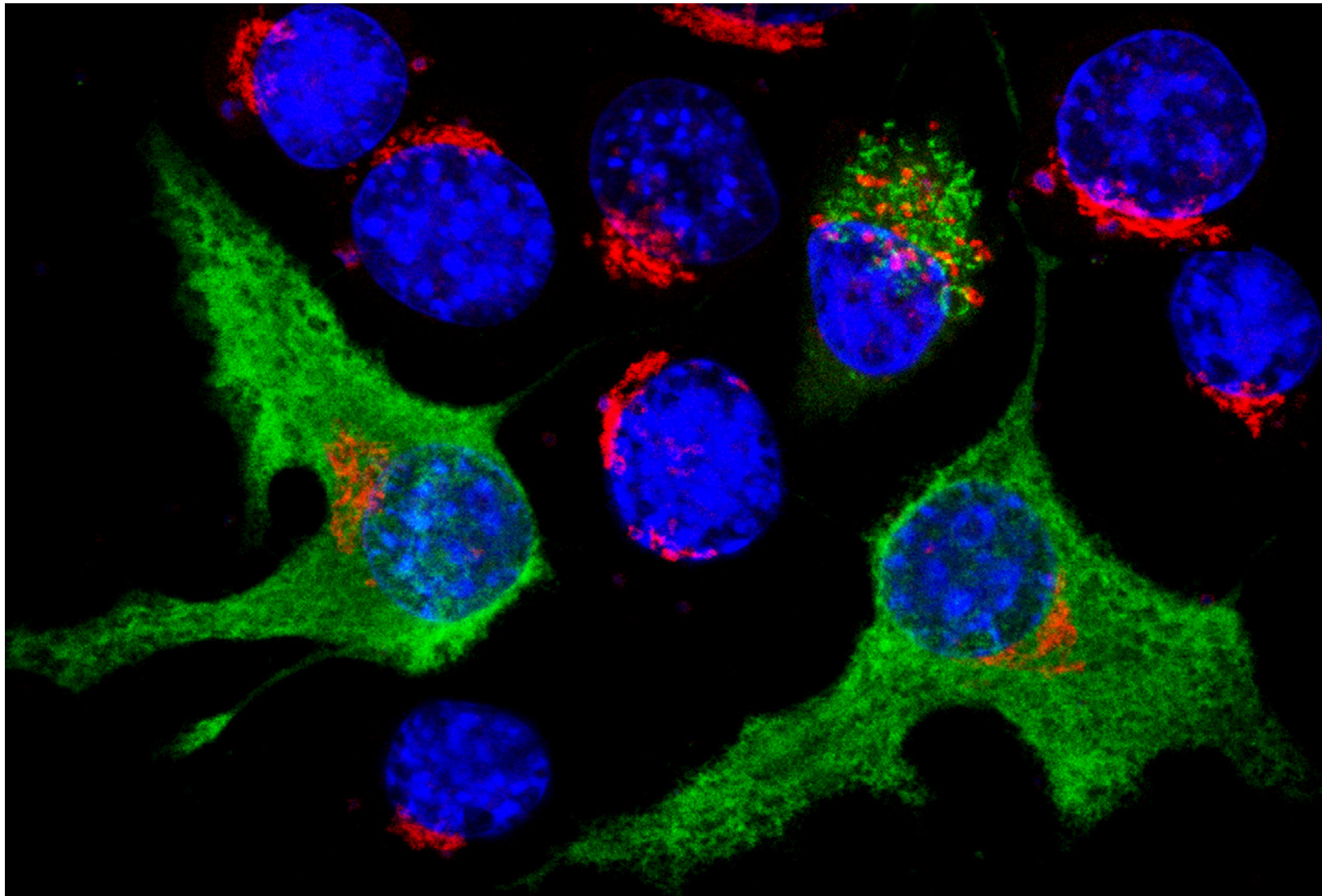
Para el marcaje específico del Aparato de Golgi se disponen de varios anticuerpos comerciales que reconocen específicamente proteínas exclusivas de este orgánulo. Con carácter general, se emplea el anticuerpo anti-golgina, con muy buenos resultados. Para marcar el Golgi cuando se emplean líneas celulares humanas es mejor marcador el que reconoce la proteína giantina. Estos anticuerpos se obtienen debido a que existe una enfermedad humana autoinmune que produce autoanticuerpos contra estas familias de proteínas, y suelen presentar un título diez veces superior de autoanticuerpos contra giantina que contra golgina.

3.4. EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Para obtener un marcaje específico de esta organela, es necesario recurrir a anticuerpos primarios que detecten alguna proteína exclusiva del orgánulo. Dos de estas proteínas disponibles comercialmente son la calnexina y la proteína disulfuro isomerasa (PDI). La PDI es una proteína que se encuentra distribuida por el lumen del retículo.

Imagen 19: Núcleos y aparato de Golgi

Cultivo de células HeLa, detección de la proteína Sur8 en verde; en color rojo se marca el Aparato de Golgi mediante un inmunomarcado contra la proteína de Golgi giantina.



Por cortesía del Dr. José María Rojas y la Dra. Natalia Martínez (UFIEC)

3.5. LOS NÚCLEOS

Sin ninguna duda, el orgánulo celular que se tiñe de manera más habitual es el núcleo. La tinción de núcleos es algo que nunca suele salir mal debido a su facilidad de realización que, sumado a su rapidez, hace de ella una técnica de rutina. La simple visualización de los núcleos ya nos da mucha información, en los tejidos nos permite distinguir regiones, en los cultivos celulares nos da información de parámetros como confluencia, estado del cultivo, contaminaciones por otros organismos, división celular, núcleos picnóticos, apoptosis, etc.

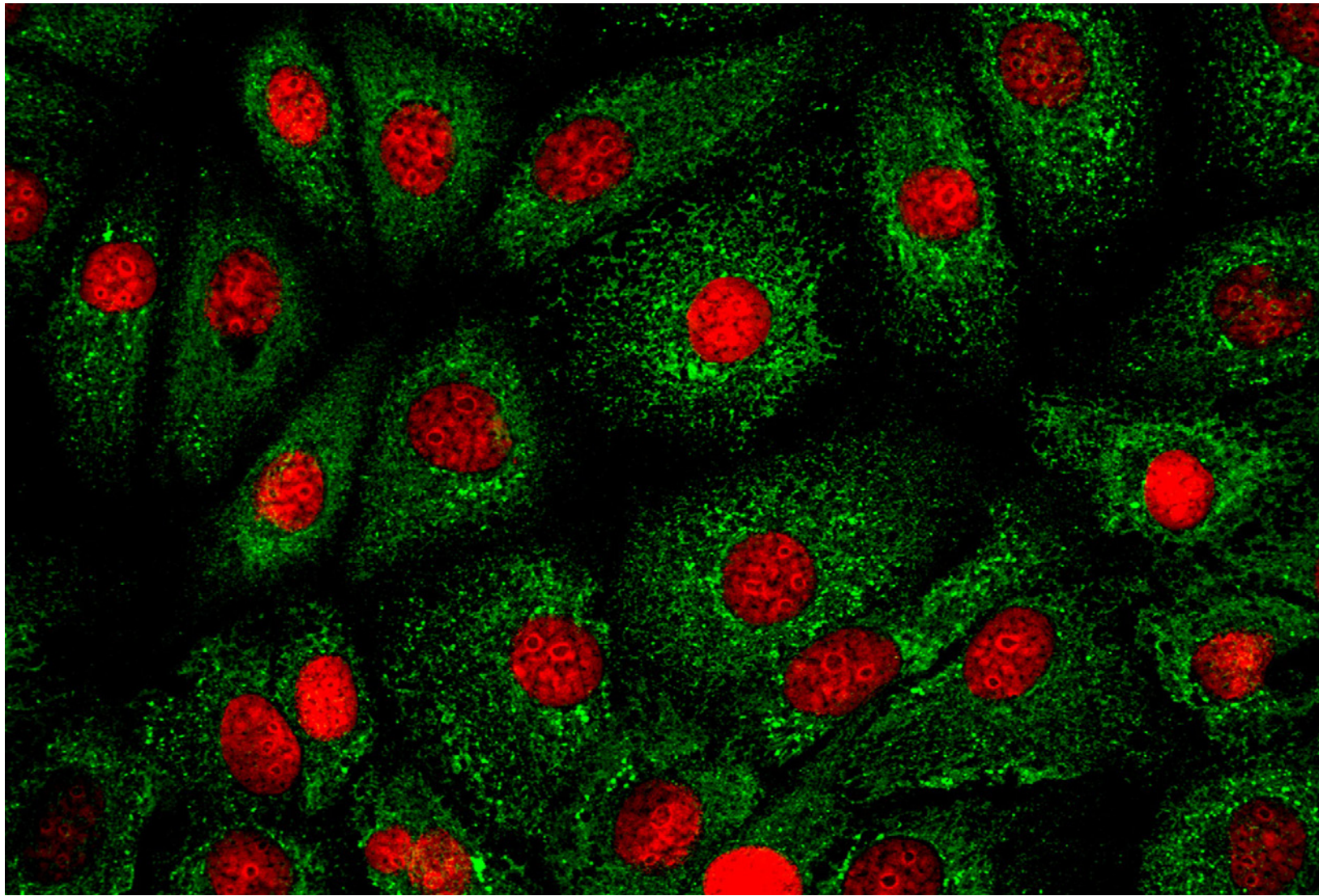
De todas las tinciones posibles, el más común es el DAPI, que emite fluorescencia en la franja azul del espectro de la luz visible. Existen otras posibilidades, como es el Hoechst un agente de tinción muy similar al DAPI. El DRAQ5 es otro agente de tinción de núcleos, se trata de un compuesto formado por una molécula intercalante del par de bases del ADN A-T y está

conjugado a un fluoróforo que emite fluorescencia en la franja del espectro de luz correspondiente al rojo lejano.

La apoptosis es un proceso controlado a través del cual una célula muere. Una de sus etapas consiste en la fragmentación del ADN, para poder saber cuáles son estas células existe una técnica que se basa en la unión del agente a los extremos OH-3' que se forman al fragmentar el ADN, esta técnica se llama TUNEL, se suele visualizar en verde al llevar la técnica un paso de detección del compuesto con FITC (fluorocromo que se excita con luz azul y emite luz verde).

Imagen 20: Núcleos y retículo endoplásmico

Cultivo de células MA104. Núcleos teñidos en rojo mediante el colorante DRAQ5, retículo endoplasmático en verde marcado mediante un anticuerpo anti-PDI monoclonal y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. Javier María Rodríguez y Dr. Daniel Luque (CNM)

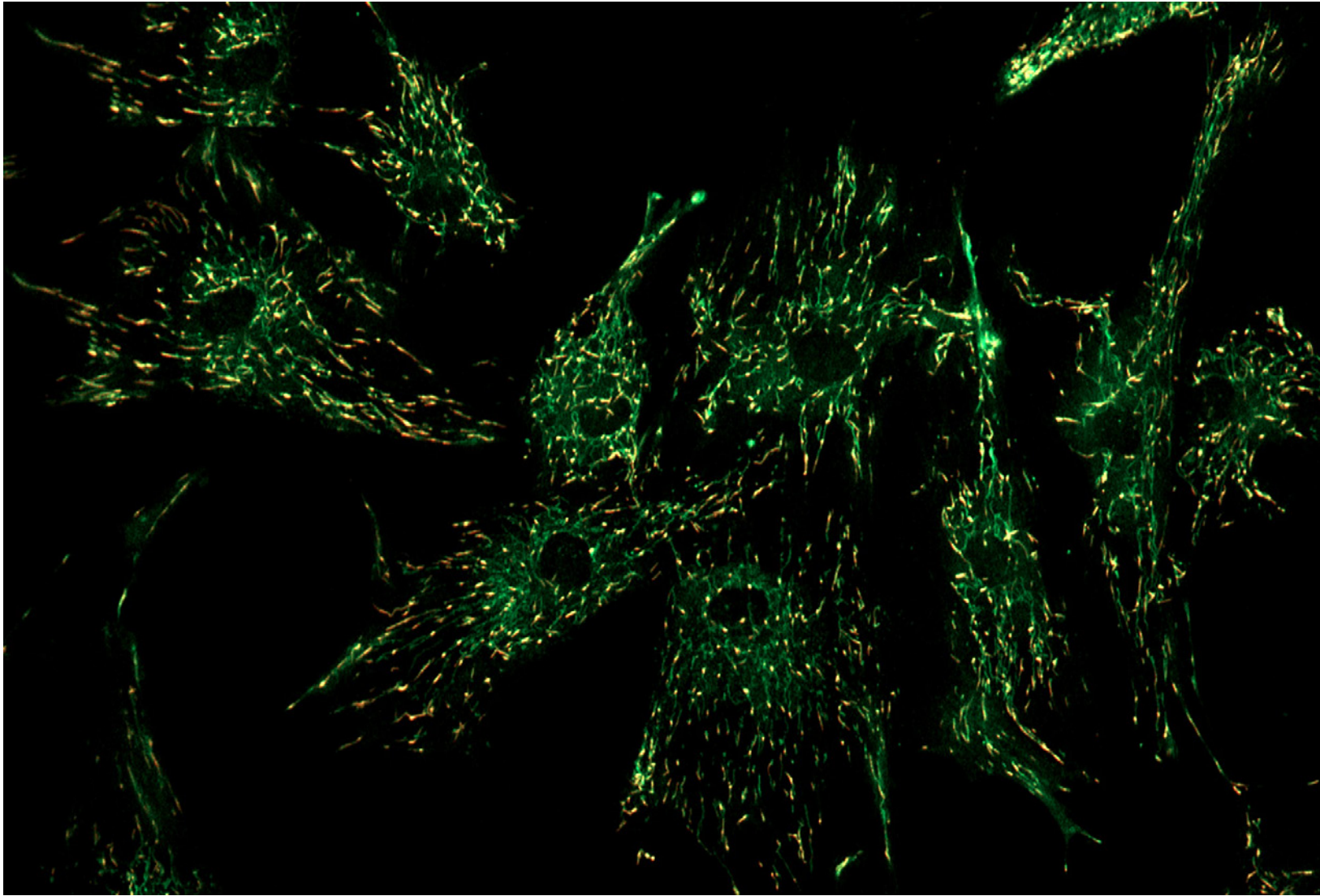
3.6. LAS MITOCONDRIAS

Una de las características únicas de las mitocondrias es la presencia de su potencial de membrana, que es negativo en su interior. Esta propiedad hace que sea fácil el poder marcarla. Para ello se pueden emplear moléculas lipofílicas catiónicas marcadas fluorescentemente que se acumulan de manera específica en las mitocondrias. Como estos compuestos son dependientes del potencial de membrana, sólo se pueden emplear en células vivas, porque transcurrido un corto periodo de tiempo posterior a la fijación éste potencial de membrana se pierde. Esta manera de marcar detectaría únicamente aquellas mitocondrias que se encuentran activas. No obstante, existen otros marcadores independientes del potencial de membrana que marcaría toda la masa mitocondrial.

Uno de los agentes más empleados en la tinción de mitocondrias es el MitoTracker, existen diferentes compuestos que pueden emitir en diferentes longitudes de onda. Una de las ventajas que presentan es que, después de ser fijadas las preparaciones, el compuesto permanece en el interior de las mitocondrias. Se añade a las células vivas, se fijan y después se continúa con el estudio.

Imagen 21: Red de mitocondrias marcadas con el compuesto JC1

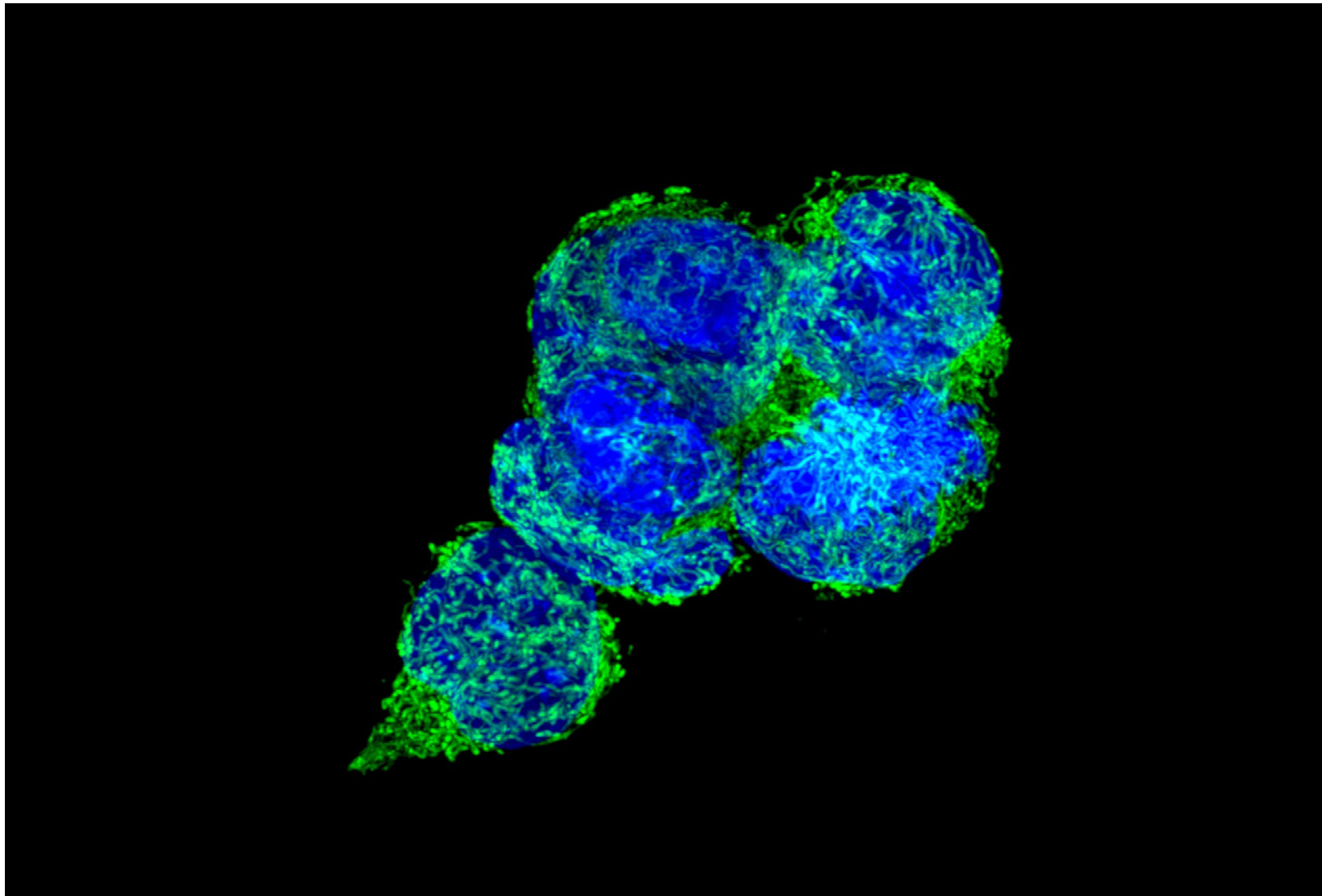
JC1 es un componente lipofílico que se incorpora a las mitocondrias, cuando estas no presentan potencial de membrana JC1 forma un monómero emitiendo en color verde, cuando la mitocondria sí presenta potencial de membrana, JC1 dimeriza y emite en color rojo. Se detectan en color verde las mitocondrias sin potencial de membrana, y del amarillo al rojo el potencial de membrana de distinta intensidad.



Por cortesía de la Dra. Yolanda Campos y la Dra. Rebeca Martín-Jiménez (UFIEC)

Imagen 22: Mitocondrias y núcleos

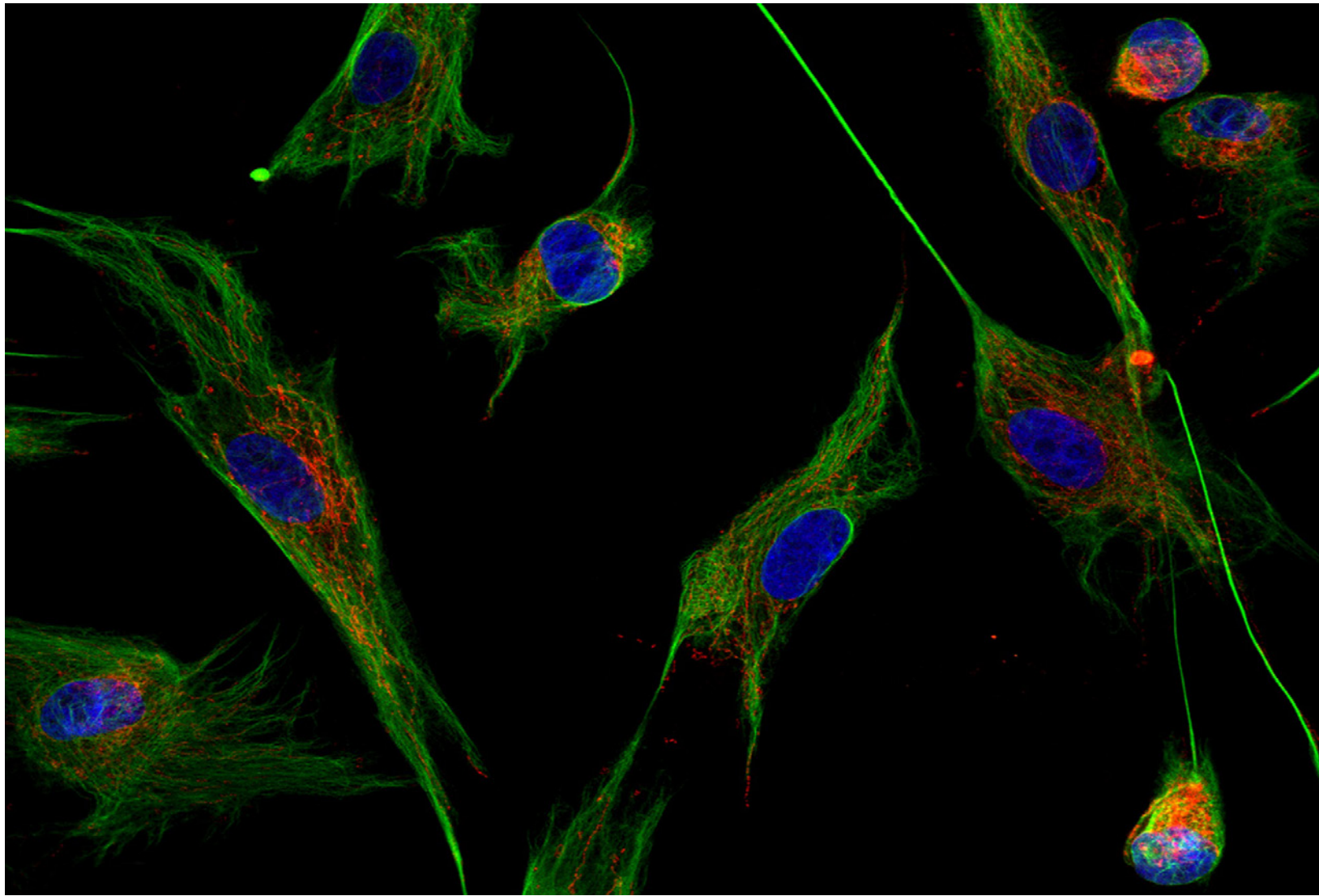
Red mitocondrial en verde y núcleos en azul.



Por cortesía del Dr. Javier García Castro, Dra. Isabel Mirones y Dr. Ander Abarrategui (IIER)

Imagen 23: Mitocondrias, núcleos y citoesqueleto

Los núcleos están teñidos con DAPI, se observan en color azul, la red de mitocondrias en color rojo y el citoesqueleto en verde.



Por cortesía de la Dra. Yolanda Campos y la Dra. Rebeca Martín-Jiménez (UFIEC)

CAPÍTULO 4. NUESTRAS DEFENSAS

El sistema inmune es el encargado de protegernos a diario frente a una gran variedad de microorganismos patógenos que se encuentran a nuestro alrededor. Está formado por órganos, tejidos y células, todos ellos especializados para realizar esta función de defensa. Cuando nuestro organismo es invadido por algún agente potencialmente nocivo el sistema inmune pone en marcha una serie de mecanismos que en su conjunto dan lugar a la denominada respuesta inmune, cuyo objetivo es neutralizar y eliminar al agente causante de la enfermedad.

Funcionalmente nuestro sistema inmune está organizado en 2 tipos de órganos: los linfoides primarios y los linfoides secundarios.

Órganos linfoides primarios: Son aquellos en los que se producen las células del sistema inmune (linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, neutrófilos). En estas localizaciones anatómicas los linfocitos maduran para adquirir su repertorio de receptores específicos para el antígeno y se seleccionan para evitar los problemas de autoinmunidad. Estos órganos son la médula ósea y el timo.

Médula Ósea: Se encuentra en el interior de los huesos y es el lugar donde se generan las células sanguíneas circulantes del adulto y donde maduran los linfocitos B.

Timo: Es un órgano bilobulado, plano y blando situado en la parte superior de la cavidad torácica, por encima del corazón. Desde la corteza del timo hasta la médula del mismo existe un gradiente de diferenciación de los timocitos (células precursoras de los linfocitos T). Posteriormente estos linfocitos T maduros y funcionales migran a los tejidos linfoides secundarios. Además en el timo existe una red de células no linfoides denominado estroma tímico, que está formado por células epiteliales, células dendríticas y macrófagos.

Órganos linfoides secundarios: El sistema linfático captura antígenos de los líquidos intersticiales de los tejidos y los lleva a los órganos linfoides secundarios para su interacción con células del sistema inmune. En estos órganos los linfocitos interactúan entre sí y con otras células que les presentan a los antígenos, de esta forma se disemina la respuesta inmune al resto del organismo. Estos órganos son el bazo, el tejido linfoide asociado a mucosas y los ganglios linfáticos.

Bazo: Es un órgano grande, de forma ovoide situado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, detrás del estómago y cerca del diafragma. En el bazo se produce la respuesta inmune frente a antígenos que han sido capturados y transportados por la sangre.

Tejido linfoide asociado a mucosas: Representa una gran superficie repleta de sitios de entrada de patógenos (mucosas

del tracto respiratorio y gastrointestinal, piel, etc.). Toda esta superficie está colonizada por linfocitos y células accesorias que permiten al organismo responder frente a una posible infección.

Ganglios linfáticos: Son redondeados, presentan un área de células B y un área de linfocitos T. Existen varios tipos de ganglios (cervicales, inguinales y axilares), estando todos ellos localizados estratégicamente a lo largo del cuerpo.

La respuesta inmune que se produce cuando un patógeno entra en nuestro organismo puede ser fundamentalmente de dos tipos:

- A. *Respuesta Inmune Innata:* Es nuestra primera barrera de defensa y ofrece una respuesta inmediata, pero no específica. El sistema inmunitario innato existe en todas las plantas y animales.
- B. *Respuesta Inmune Adaptativa:* Con esta respuesta el sistema inmune mejora el reconocimiento del agente patógeno y además guarda una memoria inmunitaria que permite al propio sistema desencadenar una respuesta más eficaz si en el futuro detecta la entrada del mismo tipo de patógeno en el organismo.

4.1. LOS ANTICUERPOS

Cuando se produce la entrada de un patógeno en el organismo y se genera una respuesta inmunológica adaptativa uno de los procesos que tienen lugar es la producción de unas moléculas denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas por los linfocitos B y que son segregadas al torrente sanguíneo. Estos anticuerpos son moléculas específicas frente a los antígenos del patógeno a combatir, por lo tanto, la principal

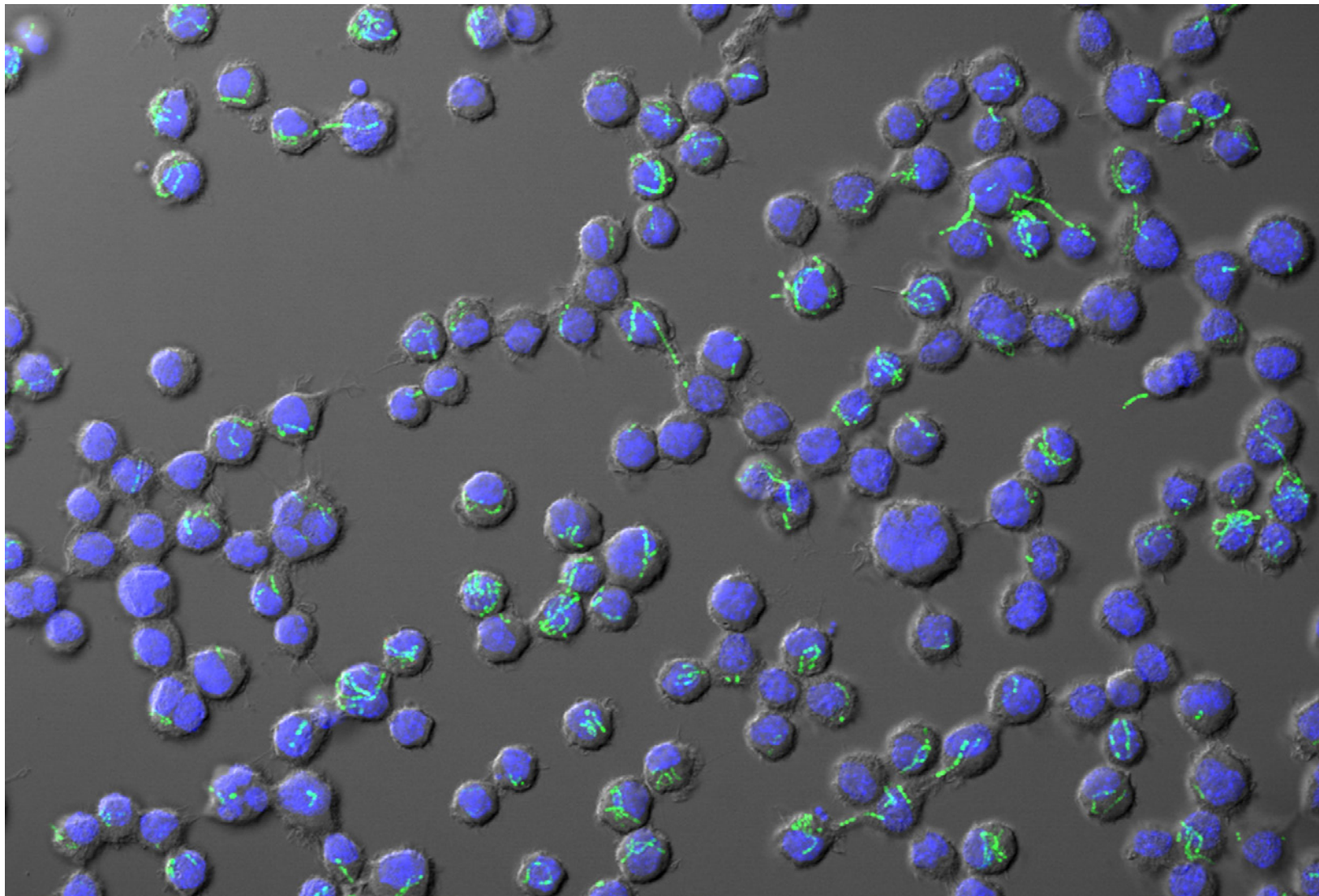
función de los anticuerpos es la neutralización de bacterias, parásitos y virus de forma específica. Los anticuerpos, una vez producidos, permanecen circulando en la sangre durante meses, lo que da lugar a una inmunidad larga y éste hecho es la base de la producción de las vacunas, creando así una inmunidad frente a ciertos organismos patógenos después de provocar la secreción de inmunoglobulinas por el sistema inmune.

Cuando un animal es inmunizado con un antígeno se produce la proliferación de los linfocitos que específicamente han reconocido a ese antígeno y, en consecuencia, la producción de anticuerpos frente al mismo.

Además, los anticuerpos son una herramienta de gran utilidad en el campo de la medicina, la bioquímica y la biología molecular por su capacidad de reconocer moléculas con diferente estructura química. Son empleados habitualmente tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de enfermedades. Para ello en muchas ocasiones es necesario acoplar moléculas detectables a los anticuerpos, estas moléculas químicas son fundamentalmente fluorocromos (absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente) o enzimas (proteínas que catalizan reacciones químicas). De esta forma podemos visualizar y analizar la unión antígeno-anticuerpo con diferentes tecnologías en el laboratorio.

Imagen 24: Oponización. Neutrófilos fagocitando *Streptococcus pneumoniae*

Los anticuerpos, que detectan de manera específica un antígeno, en este caso a bacterias (en verde), activan y favorecen la fagocitosis mediada por las células inmunitarias.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. José Yuste y la Dra. Elisa Ramos-Sevillano (CNM)

4.2. LOS COMPONENTES CELULARES DE LAS DEFENSAS

Los linfocitos

Los linfocitos son un tipo de glóbulos blancos. Son de pequeño tamaño (10 micras) y nos encontramos con 2 tipos principales: los linfocitos B y los linfocitos T. Ambos tipos se generan en la médula ósea, pero los linfocitos B maduran en esta misma localización mientras que los linfocitos T viajan al timo donde tiene lugar su maduración.

Linfocitos B: Son los encargados de la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos son capaces de unirse al patógeno ayudando de este modo al sistema inmune a destruirlo.

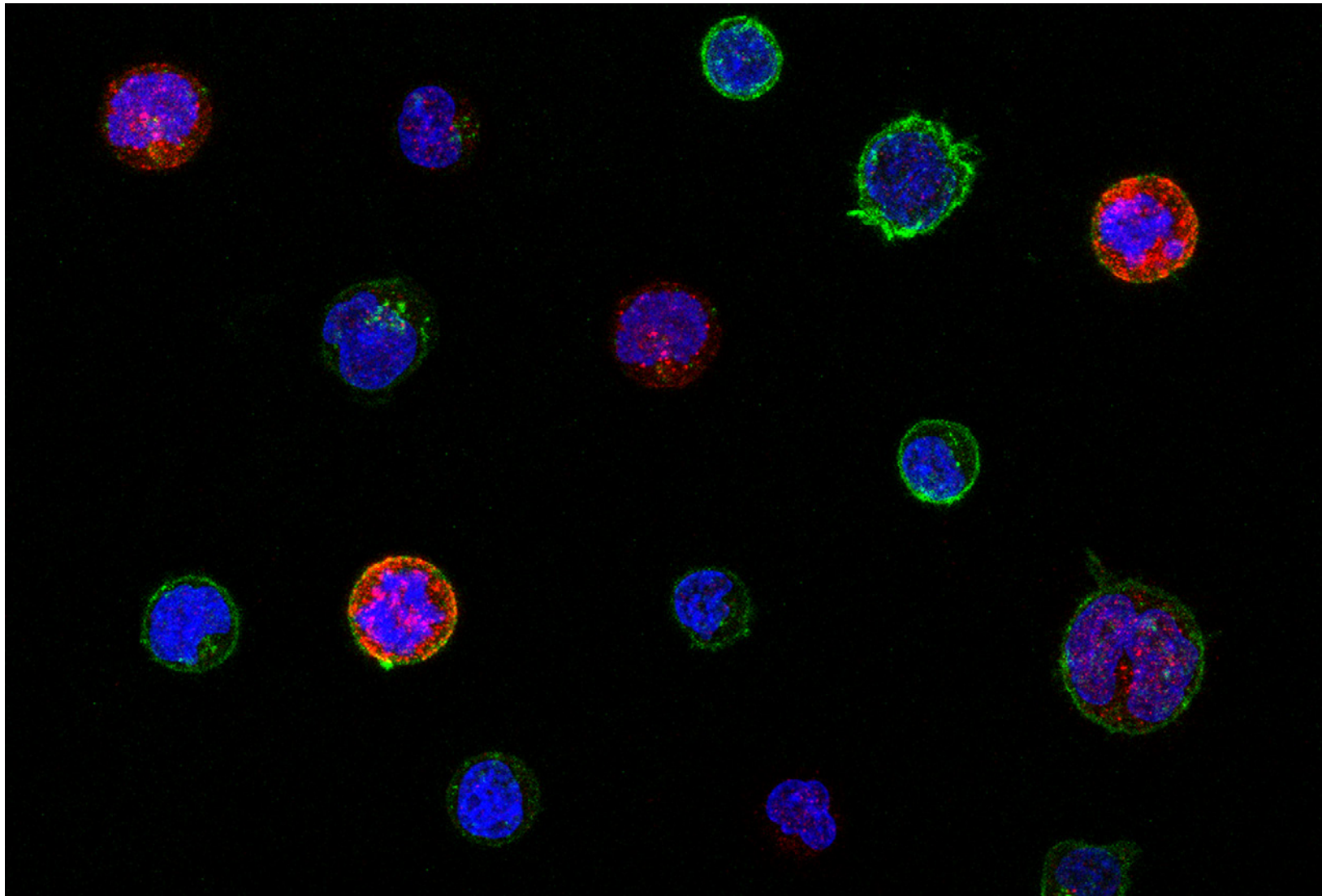
Linfocitos T: Dentro de este grupo podemos diferenciar 2 tipos: los T colaboradores que ayudan a los linfocitos B en la producción de anticuerpos y a los macrófagos en la eliminación de los patógenos y los linfocitos T citotóxicos que directamente eliminan las células infectadas.

Los linfocitos son las células encargadas de distinguir a los diferentes patógenos gracias a la presencia en su membrana de receptores antigénicos. Una vez que otras células como los macrófagos presentan el antígeno a los linfocitos en su membrana, éstos pueden comenzar a actuar y desencadenar la respuesta del sistema inmune.

Imagen 25: Los linfocitos

Los linfocitos pueden ser infectados por el virus VIH que produce el SIDA.

La membrana plasmática está marcada con FITC (verde), el núcleo con DAPI (azul) y PKX θ fosforilada en T538 está marcada con Alexa 555 (rojo). En esta imagen se observa cómo aumenta la fosforilación de PKX θ en las células que muestran su núcleo en división. Este es el primer paso para la activación celular y el VIH lo utiliza para favorecer su replicación.



Por cortesía de la Dra. Mayte Coiras (CNM)

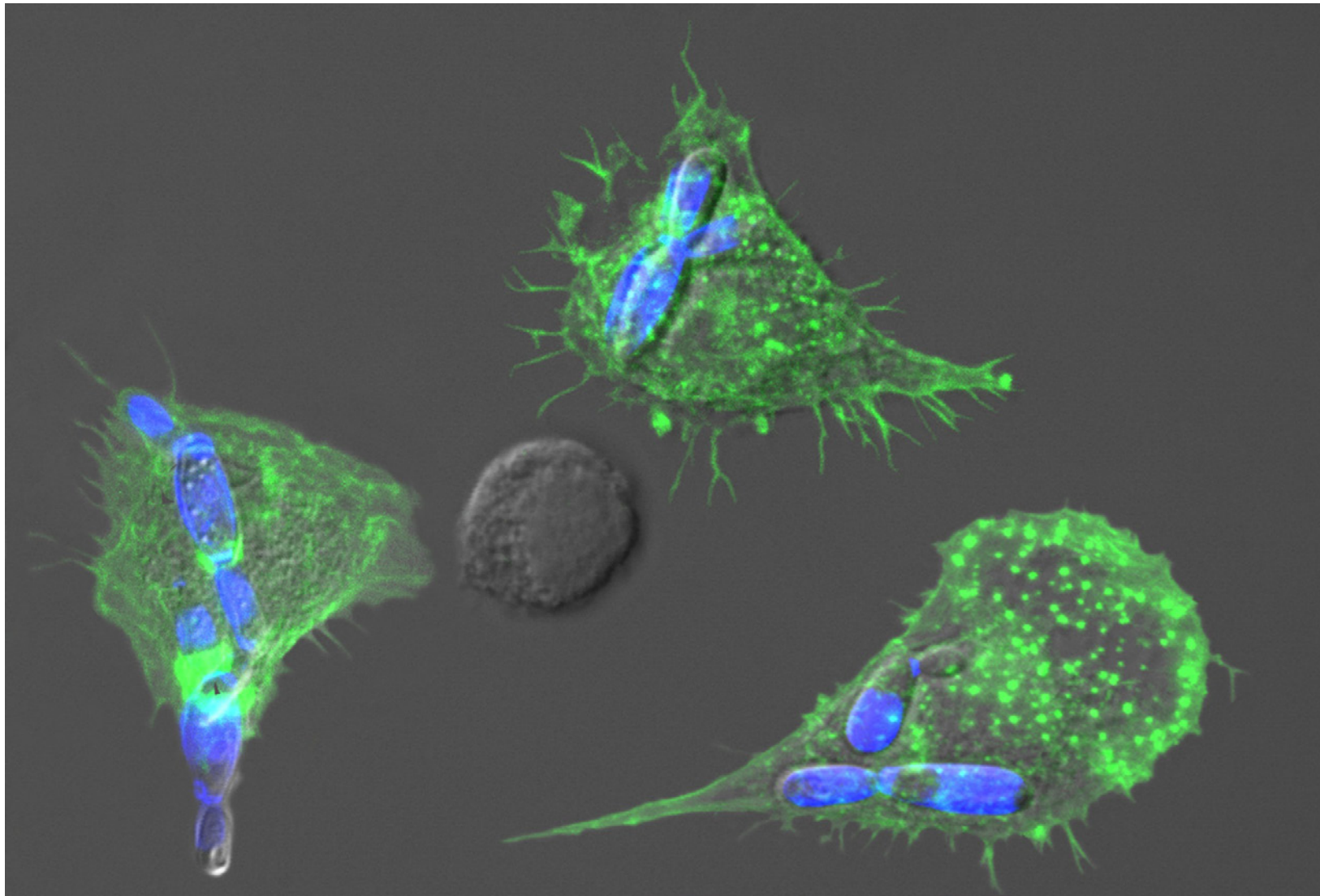
Los macrófagos

Los macrófagos son un tipo de glóbulos blancos que se generan en la médula ósea a partir de los monocitos. Posteriormente estas células migran debido a la presencia de diferentes factores como el GM-CSF y algunas interleucinas localizándose los macrófagos finalmente en los tejidos. Tienen un gran tamaño (15-30 micras) y poseen una elevada relación núcleo versus citoplasma. Su principal función es fagocitar todos los agentes extraños que se introducen en el organismo y destruirlos. Además también tienen otras funciones como la capacidad de funcionar como células presentadoras de antígeno colaborando así con otras células del sistema inmune para

organizar la respuesta frente al patógeno, y, además hay que destacar su participación en la denominada Respuesta Innata, la primera línea de defensa de nuestro organismo y su importante papel en la regulación de la homeostasis ya que contienen gránulos con moléculas importantes en el proceso de coagulación.

Imagen 26: Los macrófagos

Macrófagos fagocitando a *Candida krusei*. Se produce una polimerización de la actina en el lugar de entrada de la levadura en el macrófago. En verde se encuentra teñida la actina mediante la faloidina conjugada a FITC, el hongo está marcado en azul mediante la tinción de calcofluor White.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. Óscar Zaragoza y la Dra. Rocío García-Rodas (CNM)

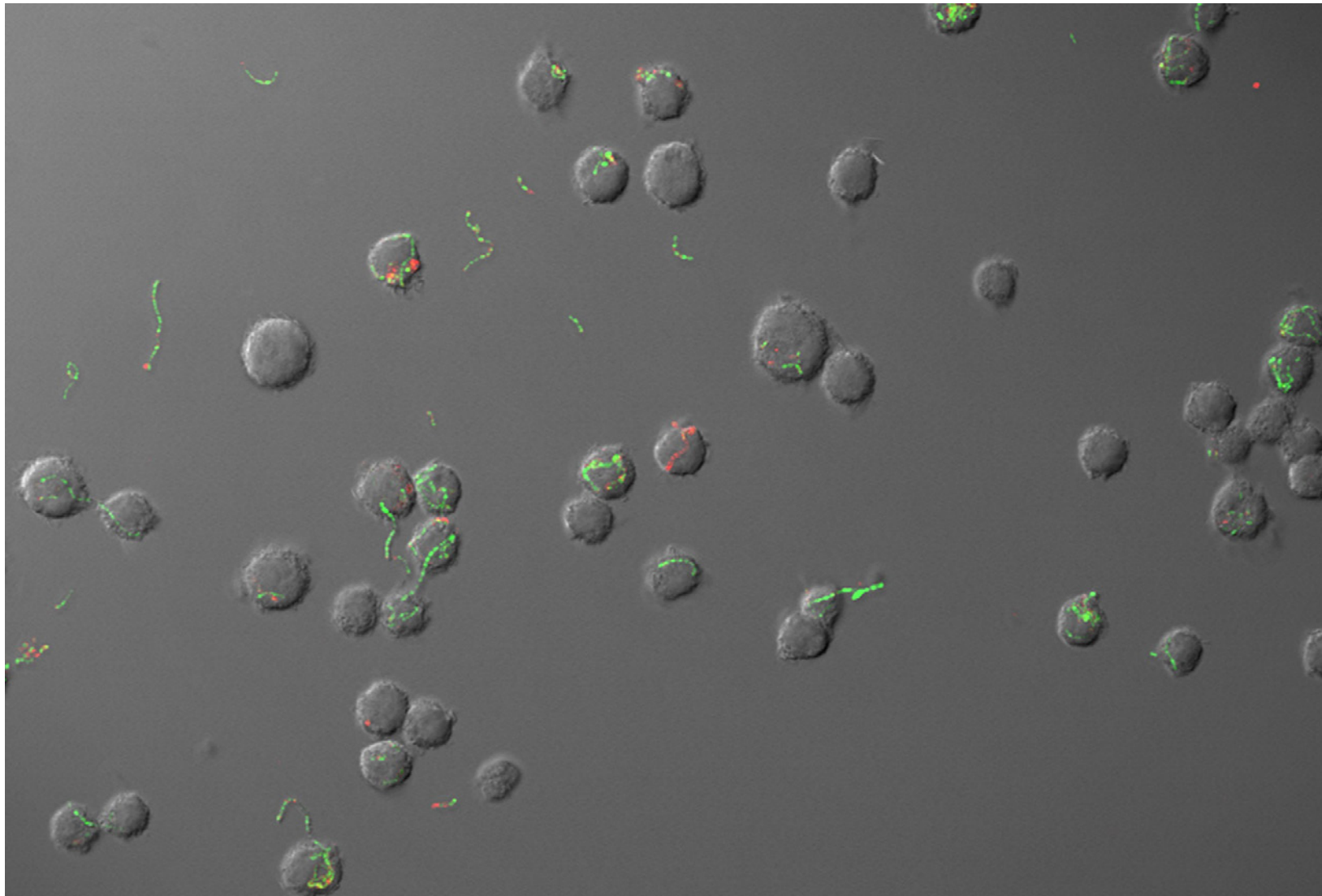
Neutrófilos

Los neutrófilos son el tipo de glóbulos blancos más frecuentes en la sangre (alrededor del 70%), pertenecen al grupo de los granulocitos, tienen un tamaño entre 9-12 micras y su vida media es de alrededor de 3 días. Se producen en la médula ósea y son células altamente móviles que rápidamente pasan a la circulación cuando se produce una infección y migran hacia el foco de la misma. Los neutrófilos contienen enzimas capaces de destruir y fagocitar al microorganismo.

Junto con otras células los neutrófilos forman parte del denominado sistema inmune innato, que no reconoce específicamente al antígeno del microorganismo sino que reconoce patrones moleculares conservados en los patógenos frente a los que reaccionan.

Imagen 27: Los neutrófilos

Neutrófilos fagocitando *Streptococcus pneumoniae*.



Por cortesía del Dr. José Yuste y la Dra. Elisa Ramos-Sevillano (CNM)

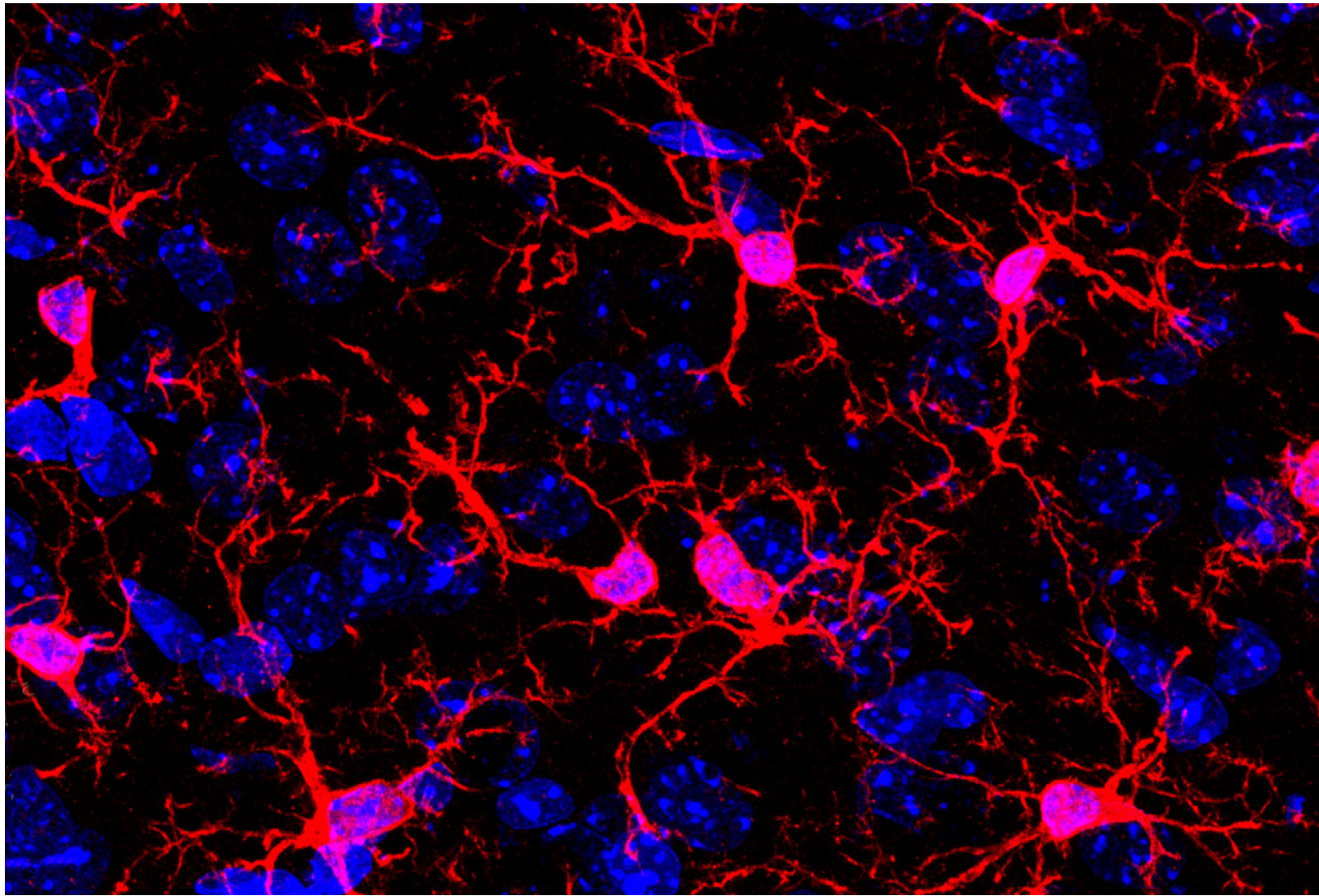
Microglía

La microglía está formada por células localizadas en el sistema nervioso central y que tienen una morfología peculiar: núcleos pequeños y alargados y citoplasmas con prolongaciones finas y ramificadas. Estas células son de origen mesodérmico, proceden de un progenitor mieloide del saco vitelino, que durante la embriogénesis migra hacia lo que será el Sistema Nervioso Central donde permanecerán. En el individuo adulto estas células localizadas en el cerebro son las células del sistema inmune innato, implicadas tanto en los procesos de inflamación como en la repuesta inmune.

Una de las características más peculiares de este tipo celular es su movimiento ameboide. Además se sabe que son células con una elevada capacidad para almacenar diferentes compuestos en su citoplasma celular como antioxidantes, neuroreceptores, leucotrienos, etc.

Imagen 28: Microglía

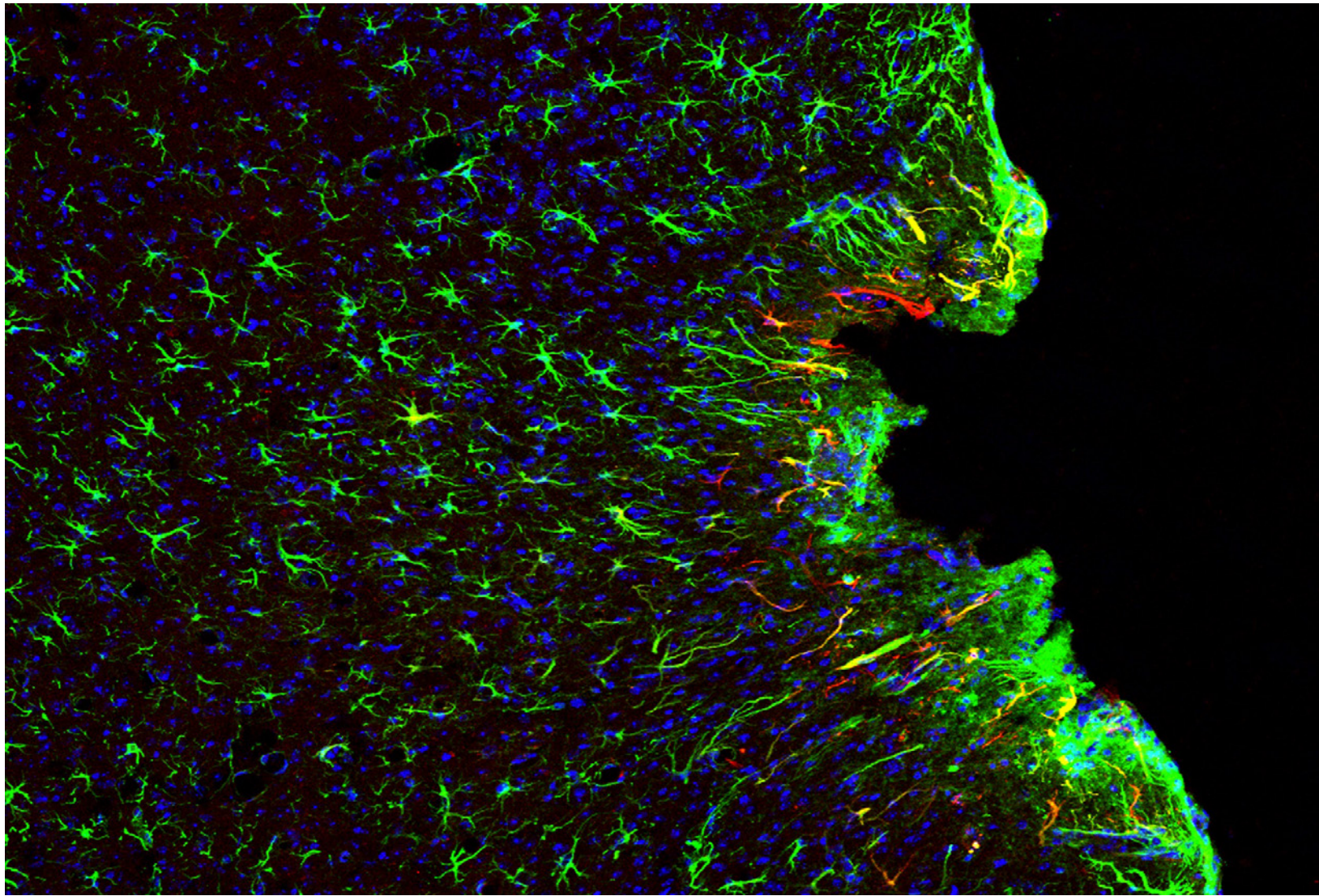
Microglía de la corteza entorrinal del cerebro de ratón CD1 marcada en rojo (Cy3) mediante inmunofluorescencia contra la proteína Iba1.



Por cortesía de la Dra. Eva Cano y Elena Quintana Menendez (UFIEC)

Imagen 29: Lesión cerebral y astrocitos

Astrocitos reactivos en verde, acudiendo al lugar donde se ha producido una lesión cerebral.



Por cortesía de la Dra. Eva Cano y la Dra. María del Carmen Serrano Pérez (UFIEC)

Megacariocitos

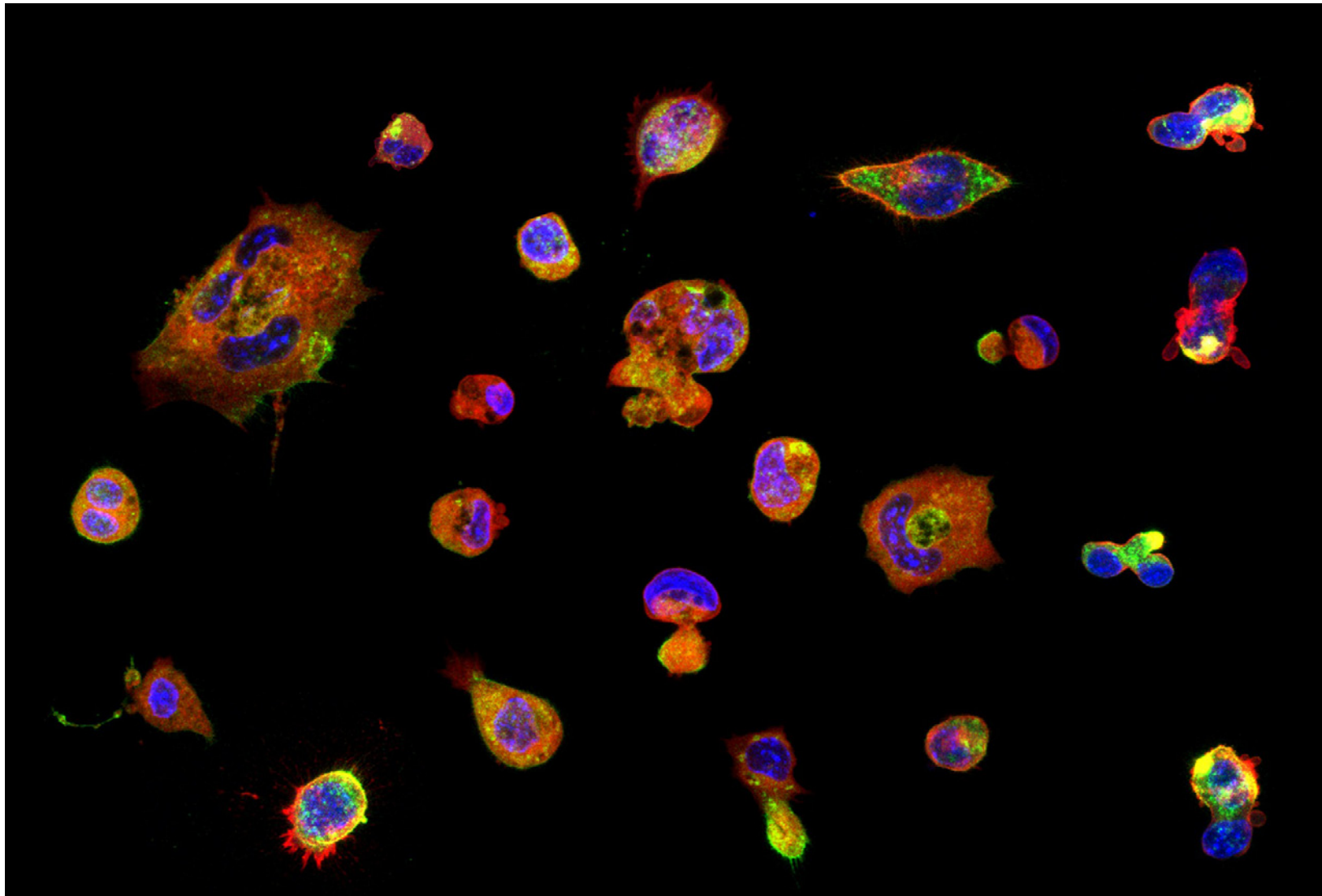
Los megacariocitos son las células precursoras de las plaquetas. Los megacariocitos se originan en la médula ósea en el individuo adulto a partir de progenitores inmaduros gracias al proceso de diferenciación hacia los diferentes linajes celulares. Tienen un gran tamaño y su núcleo es multilobulado debido a que sufren un proceso de aumento del núcleo celular sin división del citoplasma, esto hace que su cantidad de material genético o ploidía aumente de forma considerable.

Recientemente se ha descrito el importante papel de los megacariocitos en el establecimiento del nicho en el que se

desarrollan las células progenitoras más inmaduras de la médula ósea, regulando el estado de reposo o proliferación de las células madre hematopoyéticas a través de la secreción de diferentes quimoquinas.

Imagen 30: Megacariocitos

En esta imagen podemos observar a las células progenitoras de las plaquetas, denominadas megacariocitos. Son células de gran tamaño que se localizan en la médula ósea y que se caracterizan por la expresión en su membrana de unos receptores específicos cuya señal observamos con la tinción de los anticuerpos CD41 (rojo, Cy3) y CD45 (verde, FITC).



Por cortesía de la Dra. María Luisa Gaspar, la Dra. Isabel Cortegano y Carolina Ruiz (CNM)

Las plaquetas

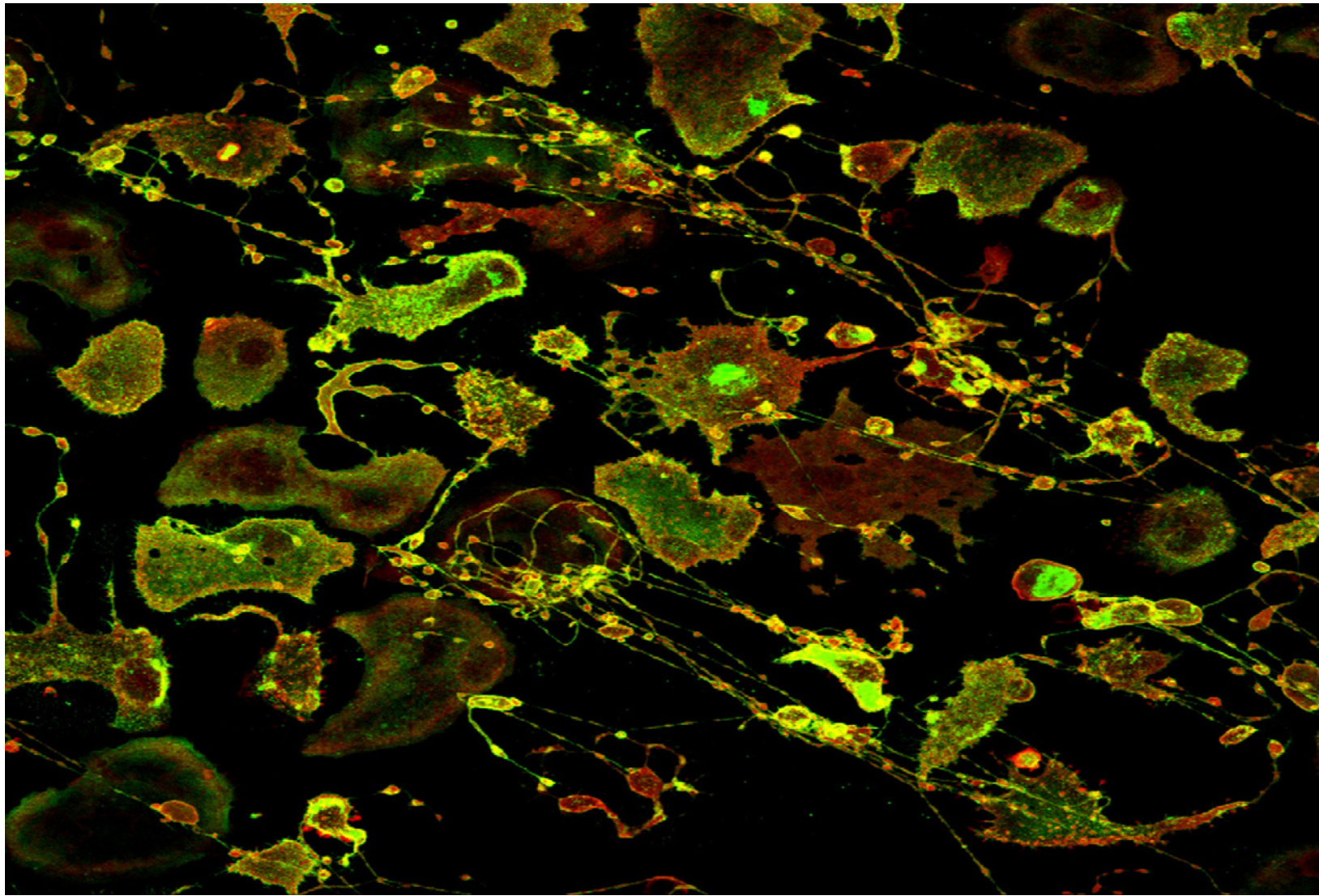
Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares que se encuentran circulando por el torrente sanguíneo. Tienen un tamaño irregular, con un diámetro entre 2 y 5 micras y hay entre $150-400 \times 10^9$ plaquetas por litro de sangre en una persona sana. La vida media de estos fragmentos celulares varía entre 8 y 10 días.

Tradicionalmente a las plaquetas se les ha atribuido el papel de «sensores» del daño celular en el endotelio del vaso sanguíneo, de ahí su importante función en el mantenimiento de la hemostasia celular. Las plaquetas son capaces de acumularse en el sitio dañado favoreciendo el cierre de la herida mediante la formación del coágulo. Para realizar esta función las plaquetas secretan factores como el vWF y la trombina. Además, en la actualidad se conocen otras funciones

importantes de las plaquetas como su papel en la respuesta innata, gracias a la expresión en su membrana de los denominados «Toll-like receptors» que reconocen patrones moleculares conservados en los patógenos. También es esencial el papel de las plaquetas en el inicio de la inflamación por su interacción con los leucocitos.

Imagen 31: Proplaquetas y plaquetas

En esta imagen observamos 2 momentos de la formación de las plaquetas que se caracterizan por dos morfologías celulares diferentes: el estadio de proplaqueta (célula con emisión de prolongaciones con engrosamientos a lo largo de las mismas) y el de estadio de plaqueta (fragmento citoplasmático pequeño y carente de núcleo que procede de la fragmentación de las proplaquetas). En esta imagen las células están marcadas con anticuerpos frente a CD41 (rojo, Cy3) y CD42c (verde, FITC).



Por cortesía de la Dra. Maria Luisa Gaspar, la Dra. Natalia Serrano y Carolina Ruiz (CNM)

CAPÍTULO 5. LOS PATÓGENOS

El gran secreto que el zorro reveló al Principito era que las cosas importantes de la vida son invisibles a los ojos. Obviamente, Antoine de Saint-Exupéry escribió su fábula en otro contexto, pero bien se podía haber referido también a la microbiología y a la importancia que los microorganismos tienen en el mundo. De hecho, se estima que más de la mitad de la biomasa de la biosfera está compuesta por microorganismos, y su metabolismo influye en la geoquímica, y composición de la atmósfera. La gran mayoría de microorganismos tienen un efecto beneficioso para el planeta. Además, también tienen un impacto positivo para la salud humana. En relación al hombre, se calcula que el cuerpo humano tiene más células de microorganismos simbiotes que humanas, y contribuyen de manera determinante en procesos como la digestión. Sin embargo, unas pocas especies de microorganismos tienen también la capacidad de comportarse como patógenos y su impacto en la salud es dramático, ya que constituyen una causa frecuente de mortalidad y tienen un impacto importante en los sistemas nacionales de salud. Por ello, la investigación en las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, ha supuesto un área prioritaria en la Biomedicina.

Las enfermedades infecciosas han estado asociadas a la humanidad desde sus comienzos, y ya en Egipto y Grecia

Antigua se describieron enfermedades infecciosas como la viruela y la lepra. Sin embargo, los microorganismos no fueron visualizados por primera vez hasta la segunda mitad del siglo XVII por Antony van Leeuwenhoek gracias al perfeccionamiento que este comerciante/científico realizó de las lentes de los microscopios, que le permitió observar objetos microscópicos con una definición y calidad que nadie había alcanzado. Desde entonces, la presencia de microorganismos se describió en múltiples ocasiones, pero hubo que esperar doscientos años, cuando Koch demostró que la causa de una de las enfermedades más devastadoras, la tuberculosis, era causada por un organismo que sólo puede ser visto a través del microscopio. Desde ese momento, la investigación en microorganismos patógenos creció de manera exponencial, ya que la tuberculosis, sífilis o peste bubónica eran plagas que causaban una mortalidad altísima en la sociedad. La investigación en enfermedades infecciosas estuvo íntimamente acompañado con el descubrimiento de los mecanismos básicos de la respuesta inmune, como fueron los anticuerpos y las células fagocíticas. Y fruto de ello, también se desarrollaron los primeros tratamientos basados en la administración de sueros inmunizados, lo cual supuso un avance en el control de las infecciones. A esto también contribuyó de manera importante la mejora en las condiciones sanitarias de las ciudades, y como no, el desarrollo de las vacunas y antimicrobianos, como la

penicilina. Gracias a estos avances, las enfermedades infecciosas se creyeron en parte controladas a mediados del siglo XX. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XX ha habido un resurgimiento importante de las enfermedades infecciosas debido a la aparición de las unidades de cuidados intensivos y tratamientos de quimioterapia o inmunosupresores, que han hecho que aumenten las infecciones oportunistas e infecciones nosocomiales. La globalización ha permitido la dispersión de enfermedades endémicas a regiones desarrolladas. Todos estos factores han hecho que también haya aumentado el número de microorganismos patógenos y la incidencia de patógenos que se pensaban controlados o restringidos. Aunque en las últimas décadas se han desarrollado un buen número de fármacos antimicrobianos (antibióticos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios), existe todavía una gran necesidad de desarrollar nuevos medicamentos, ya que para algunas infecciones el tratamiento es muy limitado o no hay ninguno efectivo, como es el caso del reciente brote de Ebola. Además, llama la atención que tras cientos de años de investigación, todavía queda mucho por conocer sobre los mecanismos de infección y la interacción de estos patógenos con el huésped, lo cual es de vital importancia para poder diseñar futuras estrategias terapéuticas efectivas.

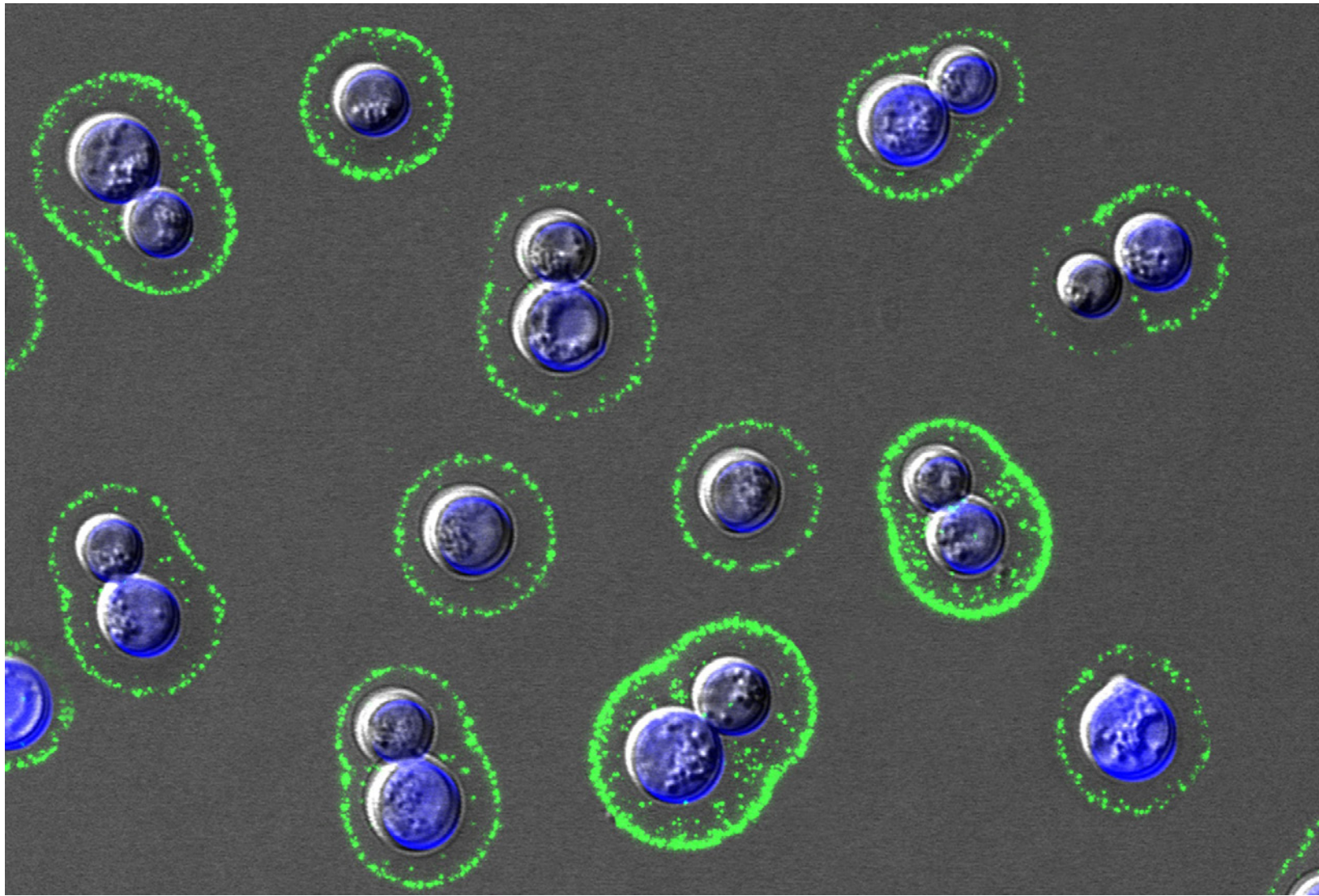
5.1. HONGOS PATÓGENOS

Los hongos contienen a una gran familia de organismos eucariotas, que abarcan desde setas hasta organismos unicelulares. Entre los hongos microscópicos, hay dos clases

principales, los hongos filamentosos o miceliales y las levaduras. Todos se caracterizan por tener una pared celular que contiene quitina. Los hongos miceliales tienen una fase filamentosa, en la que se forman hifas que tras germinar producen esporas. Las levaduras son formas unicelulares que se dividen por gemación o bipartición. En ocasiones, algunas levaduras pueden también formar formas filamentosas (hifas o pseudohifas). Existen millones de especies de levaduras y hongos filamentosos, y sólo unas pocas se comportan como patógenas. De entre éstas, la mayoría causan infecciones superficiales, como tiñas y el pie de atleta. Sin embargo, algunas especies pueden también causar infecciones oportunistas diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. Entre ellos, afectan principalmente a pacientes oncohematológicos, transplantados o con terapia inmunosupresora, enfermos que ha sufrido cirugía grave y HIV+. Los principales géneros de hongos filamentosos patógenos son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* y hongos mucorales. Entre las levaduras, las más frecuentes son *Candida* y *Cryptococcus*. Su diagnóstico suele ser tardío, por lo que es necesario desarrollar herramientas diagnósticas que proporcionen una detección precoz de la infección.

Imagen 32: *Cryptococcus neoformans*

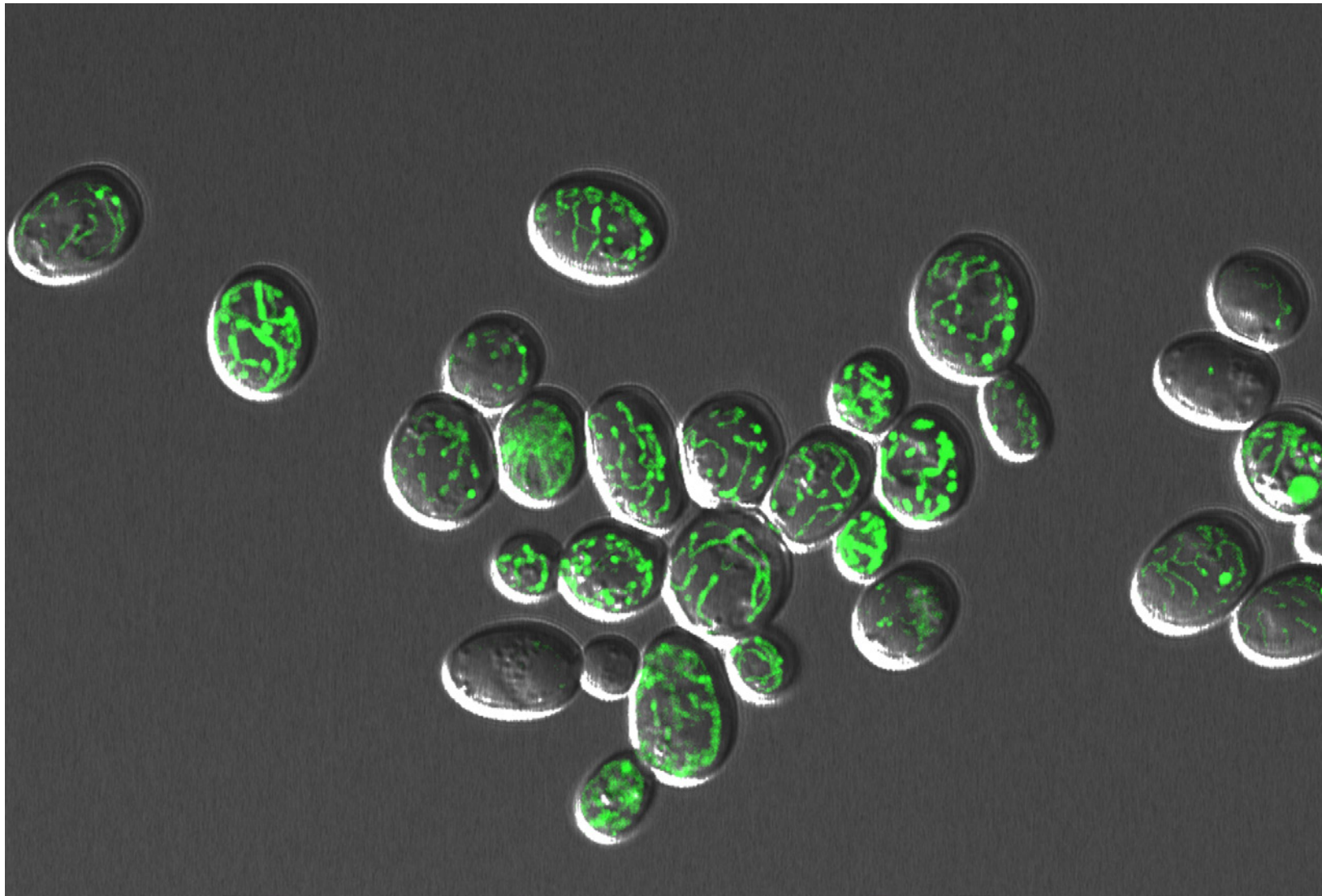
Este hongo es capaz de producir neumonía y meningitis en pacientes inmunodeprimidos. Esta levadura es capaz de replicarse en el interior de los macrófagos y la cápsula polisacárida es el principal factor de virulencia. En verde está teñida la cápsula celular, detectada mediante inmunofluorescencia; la pared celular está teñida en azul con el colorante Calcofluor.



Por cortesía del Dr. Óscar Zaragoza y la Dra. Rocío García-Rodas (CNM)

Imagen 33: *Candida tropicalis*

Células de la levadura *Candida tropicalis* en las que las mitocondrias se han teñido con Mitotracker Green, de manera que se ven como túbulos o puntos dispersos.



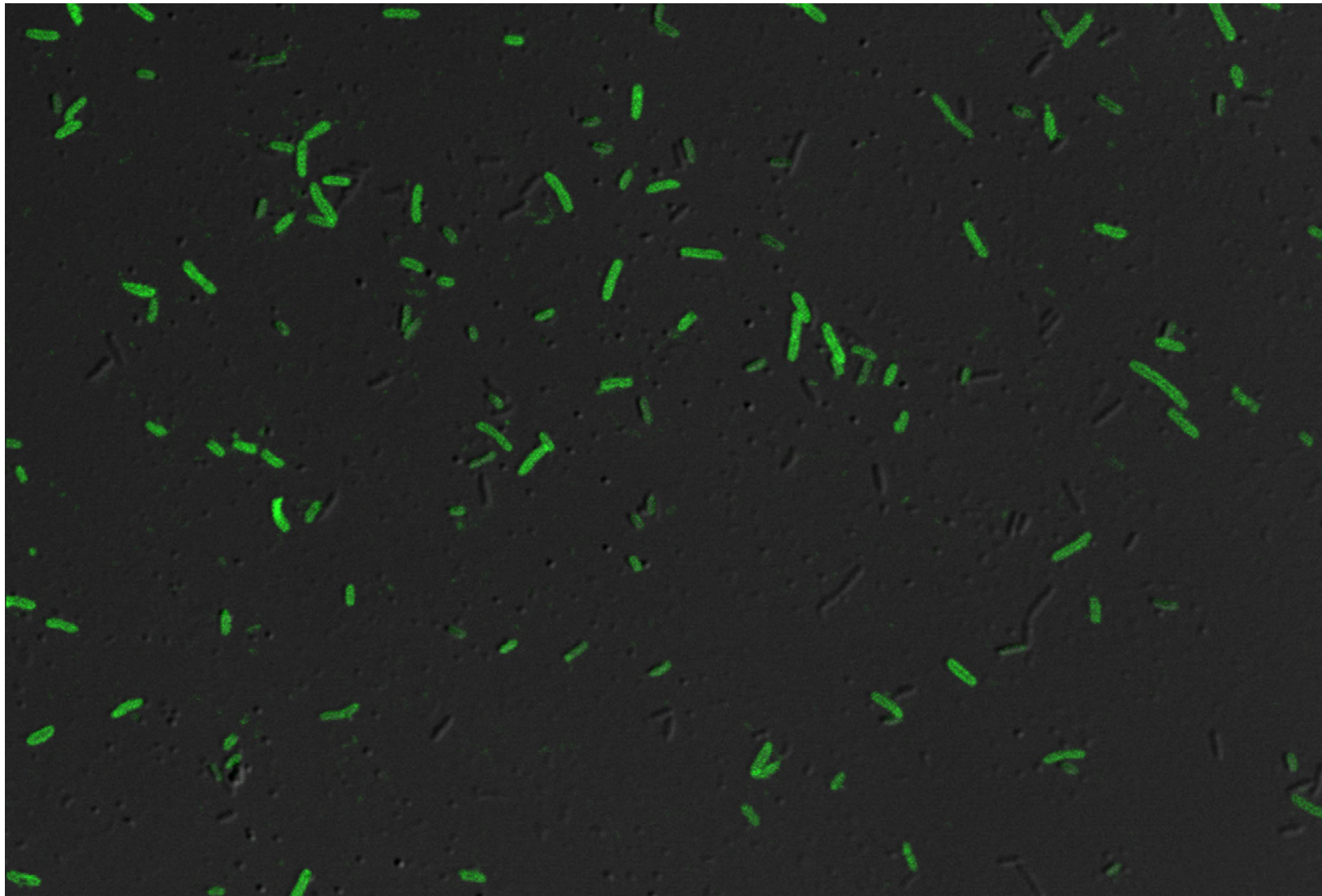
Por cortesía del Dr. Óscar Zaragoza y la Dra. Ana Cecilia Mesa (CNM)

5.2. BACTERIOLOGÍA

Las bacterias son microorganismos procariotas, es decir, carecen de membrana nuclear. Tienen tamaño pequeño, que oscila de 0,5 a 3 micras, con lo que para su visualización es necesario utilizar objetivos con un alto número de aumentos. En general, tienen una pared celular alrededor de la membrana. Muchas bacterias tienen también una cápsula, que en el caso de las bacterias patógenas juega un papel determinante en las propiedades antigénicas durante la infección. Sólo tienen un cromosoma, compuesto por ADN circular. Además, también es frecuente la presencia de plásmidos, que pueden ser transferidos entre bacterias mediante un proceso llamado conjugación. Las bacterias se clasifican según su forma, que puede ser redonda (cocos), elipsoidal alargada (bacilos) o espiral (espiroquetas).

Además, también se clasifican como Gram-positivas o Gram-negativas en función de la reactividad que presentan en la tinción del mismo nombre. Las bacterias patógenas suponen un problema sanitario de primer orden, ya que tienen una gran incidencia y una alta mortalidad asociada. Muchos factores contribuyen a la virulencia de las bacterias, como son la producción de toxinas, su rápida tasa de crecimiento, y la capacidad de evadir el sistema inmune. En ese sentido, muchas, como *Mycobacterium tuberculosis*, se comportan como patógenos intracelulares. Por ello, hay una gran necesidad para entender los mecanismos de virulencia de estos microorganismos.

Imagen 34: *Legionella pneumophila* serogrupo 1 subgrupo Pontiac Knoxville



Por cortesía de la Dra. Carmen Pelaz y Consuelo Elola Vega (CNM)

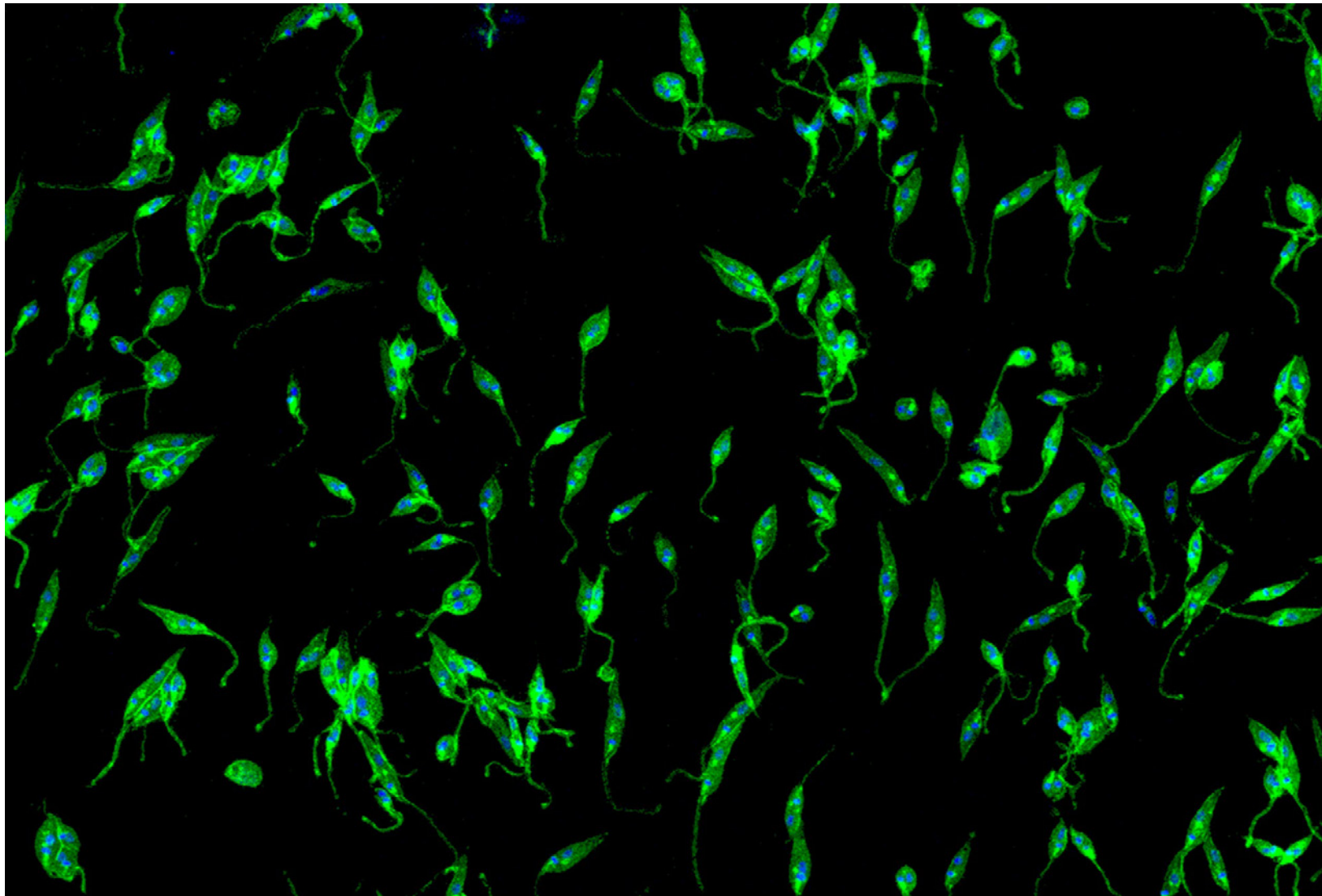
5.3. LOS PARÁSITOS

Los parásitos abarcan a un grupo muy heterogéneo de organismos, que pueden ser unicelulares o pluricelulares (como son algunas clases de nematodos), y que se caracterizan por ser organismos de vida libre que pasan una parte muy significativa de su ciclo de vida dentro de un huésped, al cual pueden causarle daño y enfermedad. Se definen como endoparásitos o ectoparásitos según se encuentre en órganos internos o de manera superficial, respectivamente. En muchos casos, suelen adquirirse por contacto directo entre personas infectadas o por ruta oral, tras ingerir alimentos poco cocinados y que están infectados por parásitos. También es frecuente adquirirlos a través de artrópodos que transmiten parásitos. Según su ciclo de vida pueden encontrarse como trofozoitos, esporozitos, merozoitos gametocitos o quistes. En el caso de parásitos humanos unicelulares, los que más incidencia tienen son

Plasmodium falciparum (causante de la malaria), *Leishmania*, amebas (como *Dictyostelium*, *Acanthamoeba* o *Naegleria*), *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* (que produce la enfermedad de Chagas) y *Trypanosoma brucei* (que produce la trypanosomiasis africana). Con respecto a los parásitos pluricelulares, los más frecuentes son los helmintos, entre los que se encuentran *Taenia*, *Trichinella*, *Echinococcus*, *Fasciola*, *Schistosoma*, *Ascaris*, y que suelen colonizar el intestino y otros órganos como la linfa, la sangre, hígado, corazón o pulmones.

Imagen 35: *Leishmania*

Leishmania es un protozoo flagelado que se transmite por el díptero flebotomo y produce la leishmaniosis. Esta enfermedad puede afectar tanto a perros como a humanos y tiene como reservorio a animales silvestres como liebres y roedores.



Por cortesía de la Dra. Mercedes Domínguez y la Dra. Inmaculada Moreno Iruela (CNM)

5.4. LOS VIRUS

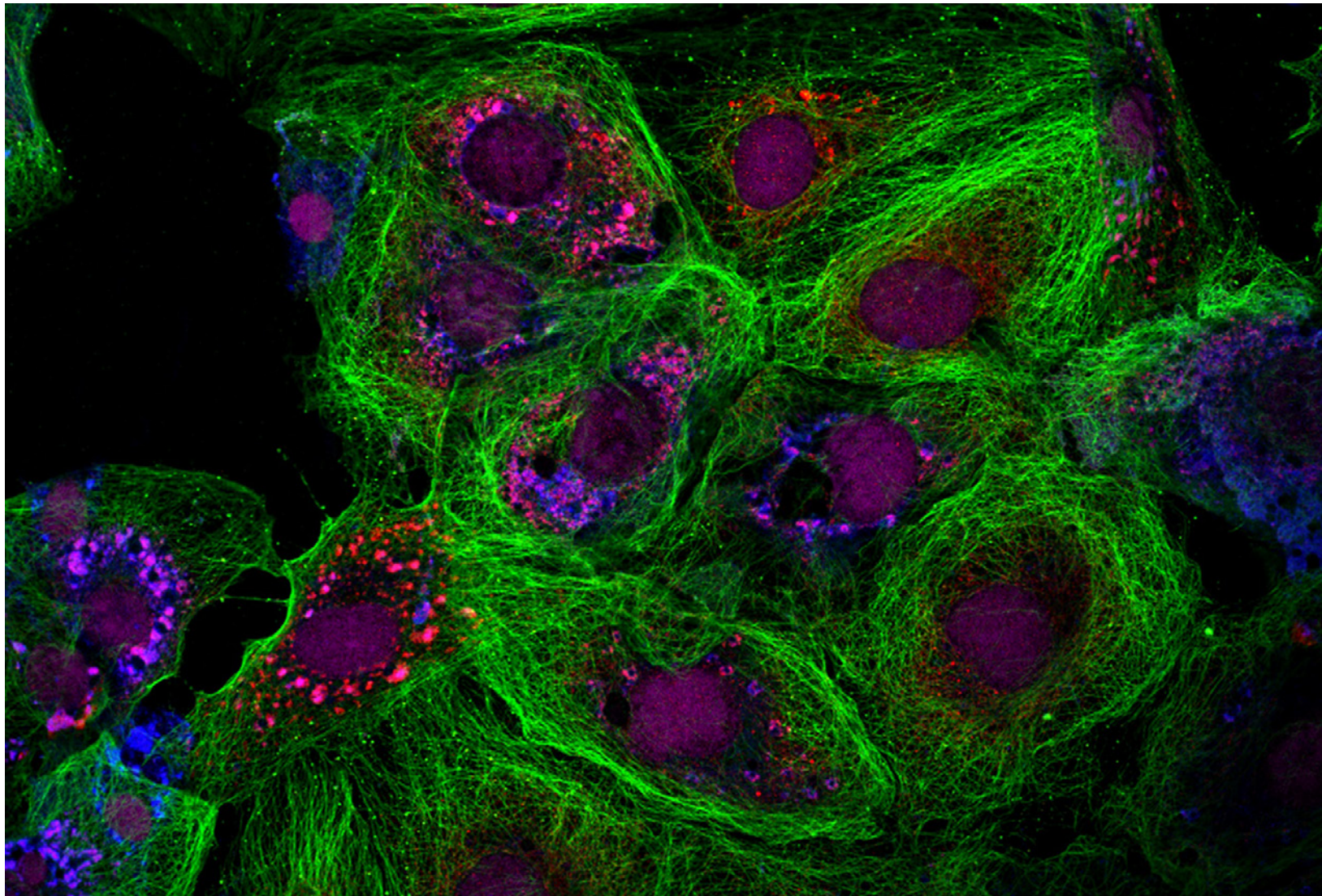
Los virus suponen todo un reto desde un punto de vista microscópico, ya que debido a su tamaño no son visibles con los microscopios ópticos convencionales. De hecho, no fueron observados hasta que se desarrollaron los microscopios electrónicos en los años 30, aunque su existencia se conoce desde principios del siglo XX. También se ponen de manifiesto cuando son marcados con anticuerpos fluorescentes, y por lo tanto es una técnica vital para poder estudiarlos.

Los virus tienen una estructura muy sencilla. Se componen de una cadena de material genético, que puede ser ADN o ARN de cadena sencilla o doble cadena, el cual está rodeado de una cápside compuesta principalmente de proteínas. Con respecto a su ciclo de vida, los virus deben multiplicarse dentro de las células del huésped. En primer lugar, el virus se adhiere a la membrana y se internaliza. Una vez dentro, se libera el genoma, el cual utiliza la máquina replicativa de la célula del huésped para dividir su ADN o ARN. En su genoma, se codifican las

proteínas de la cápside, las cuales se expresan y forman nuevas partículas virales que salen de la célula. Existen un gran número de virus, que infectan desde bacterias hasta mamíferos superiores. Los virus causan un gran número de enfermedades y han sido el origen de algunas de las grandes pandemias que han azotado la humanidad, como la rabia, la gripe, el SIDA, o Ebola. Además, algunos virus son capaces de inducir tumores y cáncer, como el sarcoma de Rous, sarcoma de Kaposi o cáncer cervical.

Imagen 36: Rotavirus

Cultivo de células MA104 infectado con Rotavirus. En verde se muestra el citoesqueleto de tubulina detectado con un anticuerpo monoclonal anti α tubulina, en magenta se tiñen los núcleos con el colorante DraQ5, la proteína del virus VP2 se detecta con un anticuerpo de cobaya y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo que se excita a 405nm y emite en azul, el retículo endoplásmico se marca mediante la detección de la proteína PDI y un anticuerpo secundario que emite en rojo.



Dr. Fernando González-Camacho en colaboración con el Dr. Javier María Rodríguez y el Dr. Daniel Luque (CNM)

CAPÍTULO 6. LOS MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Los modelos animales se han utilizado en investigación desde hace muchísimos años y constituyen un paso fundamental en el estudio de las enfermedades humanas. Su uso se ha ido acotando poco a poco, pero sigue siendo un pilar insustituible en multitud de estudios.

Se emplean fundamentalmente en la docencia, la investigación y la industria.

En la docencia se utilizan en prácticas para aprender y observar procesos fisiológicos, características anatómicas, y adquirir las destrezas necesarias en cirugía. En este campo se está reduciendo mucho el empleo de animales siendo reemplazado por alternativas como simulaciones por ordenador.

Dentro de la industria, donde más se emplean animales de laboratorio son, en la prueba y producción de nuevas moléculas de interés, como pueden ser los fármacos; y en las pruebas de seguridad y toxicidad de productos de consumo, como puede ser la cosmética. En este campo también se está intentando reducir el número de animales que se emplean con estos fines, para ello se están introduciendo modelos matemáticos y la simulación por ordenador de las interacciones fármaco-proteína (modelo *in silico*).

En investigación se emplean para progresar en el conocimiento científico, como modelos en el estudio de enfermedades y para probar y desarrollar nuevas terapias.

Los animales se emplean para garantizar la seguridad de los nuevos fármacos antes de ser administrados a las personas durante los ensayos clínicos, esta etapa previa se conoce como ensayos preclínicos y están encaminados a evaluar su toxicidad, la eficacia, vía de administración, efectos secundarios y validar su potencial terapéutico. Estos ensayos preclínicos primero se realizan sobre cultivos celulares, y en una etapa posterior, sobre animales de laboratorio.

Además de emplearse en los campos ya citados, los animales también son necesarios para la obtención de sueros y proteínas sanguíneas, producción de vacunas, producción de anticuerpos que serán empleados en multitud de técnicas de laboratorio (inmunoensayos), producción de anticuerpos con fines terapéuticos, obtención de células y órganos.

La comunidad científica no es insensible a los prejuicios éticos y morales que supone el trabajar y sacrificar animales. En una sociedad del bienestar y el conocimiento no queda justificado ejercer crueldad sobre los animales y es responsabilidad de la comunidad científica no ocasionar daños innecesarios. Por ello,

se ha convertido en una prioridad buscar formas de reemplazar y reducir el número de animales en la experimentación.

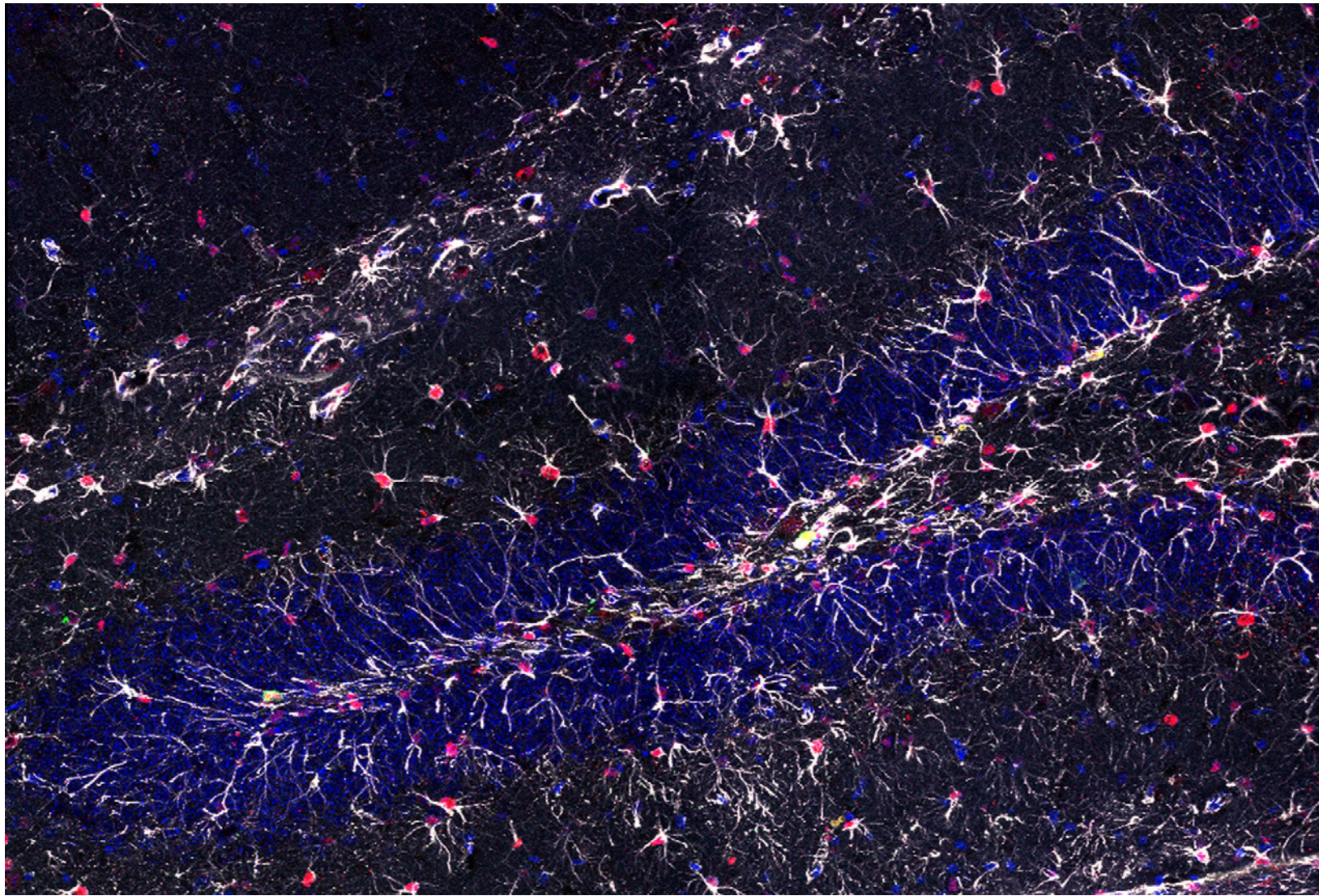
Para garantizar el bienestar de los animales, su cuidado, evitar el dolor y el estrés, se ha desarrollado una legislación muy estricta y se han establecido comités de bioética que velan por el cumplimiento de estos objetivos.

Los fundamentos para un uso racional de los animales se basan en el principio de las tres R's: Reducir, reemplazar y refinar. Reducir implica utilizar el menor número posible de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos. Reemplazar es sustituir el empleo de animales por métodos alternativos como son los modelos matemáticos, cultivos celulares, simulación por computación (modelos *in silico*), siempre que sea posible. Refinamiento supone utilizar estándares internacionales de procedimientos encaminados a minimizar el dolor y asegurar el bienestar de los animales. Asegurar el bienestar de los animales implica obtener resultados más fiables y supone, en la práctica, la reducción en el número de experimentos necesarios a realizar.

Los métodos alternativos al empleo de animales nos son muy útiles para disminuir el número de animales necesarios en la experimentación, pero no pueden predecir con fiabilidad los efectos que tendrían en un organismo debido a la gran complejidad de un ser vivo completo. En la actualidad, lo más razonable parece ser considerar el empleo de animales como modelos como una herramienta imprescindible para la investigación, prevención y cura de enfermedades humanas, empleando en la medida de lo posible alternativas válidas, reducir el número de animales a emplear y disminuir el sufrimiento de los animales.

Imagen 37: Hipocampo de ratón

Giro dentado del hipocampo del ratón. Los modelos animales son un paso necesario en la investigación y suponen un escalón intermedio entre un sistema de investigación *in vitro* como son los cultivos celulares y los ensayos y aplicación en organismos vivos. Existe legislación nacional e internacional que regula su uso y un comité ético que vela por el cumplimiento de la normativa.



Por cortesía de la Dra. Helena Mira y la Dra. María Díaz-Moreno (UFIEC)

EL RATÓN COMO MODELO EN INVESTIGACIÓN

Se emplean muchos animales como modelos en la investigación, pero es, sin duda, el ratón el más utilizado en la mayoría de los experimentos en los campos de la medicina y la biología.

Los ratones muestran una serie de ventajas con respecto a otros animales de experimentación; son animales complejos capaces de reproducir enfermedades humanas, son pequeños y manejables, fácil su mantenimiento no muy costoso, con un corto periodo reproductivo con camadas grandes. Otra serie de

ventajas son las metodológicas, se puede manipular su carga genética con relativa facilidad, se poseen herramientas moleculares como son sondas de cDNA y abundantes anticuerpos específicos, existen más de 450 cepas consanguíneas diferentes y existe un bagaje histórico en los laboratorios muy importante.

Imagen 38: Esquema de un corte de cerebro de ratón

Esquema: **A:** hemisferio izquierdo; **B:** hemisferio derecho; **C:** corteza cerebral; **D:** Cuerpo calloso; **E:** ventrículo lateral; **F:** tercer ventrículo; **G:** región CA del hipocampo; **H:** giro dentado del hipocampo.

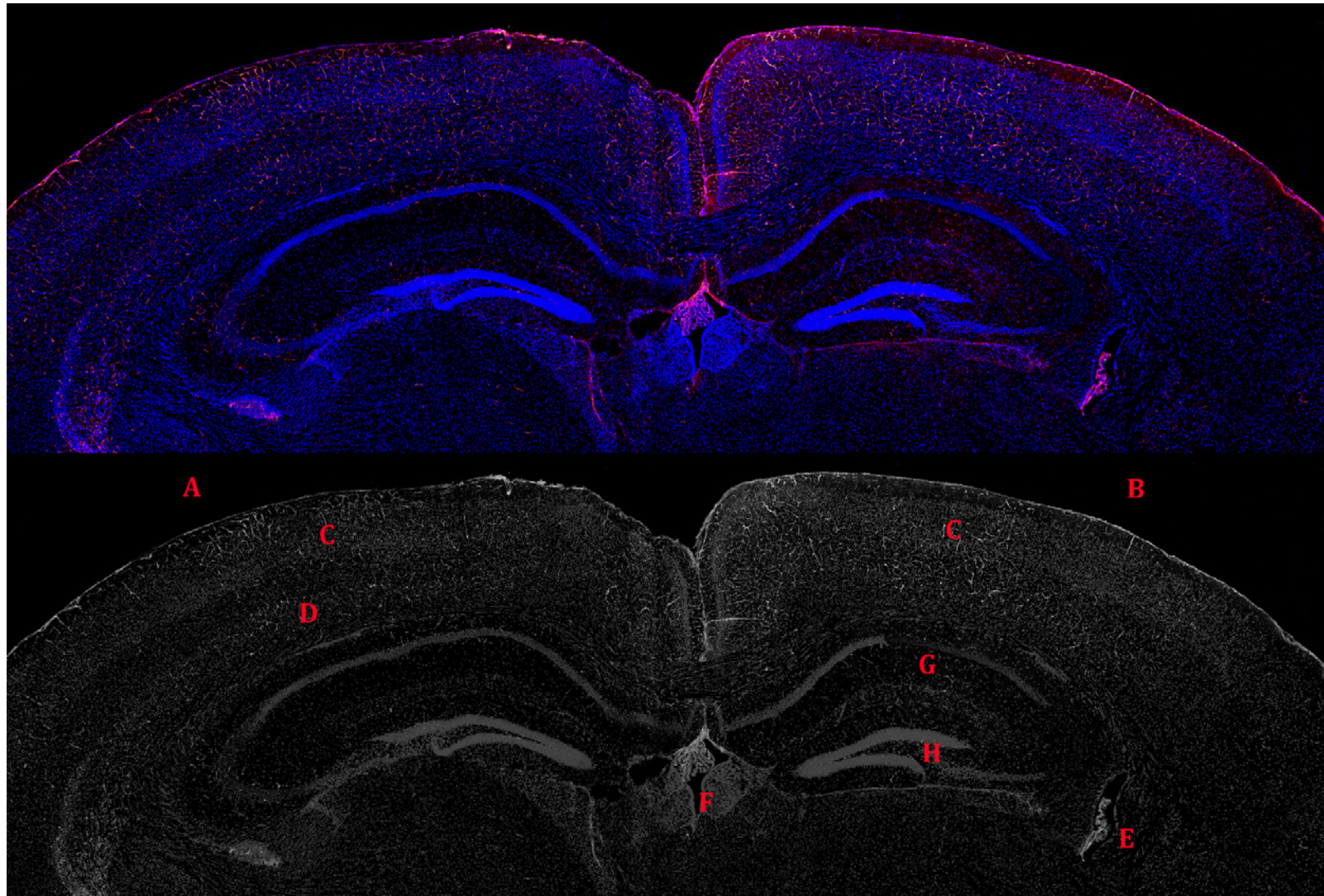


Imagen: por cortesía de la Dra. Pilar Sánchez y la Dra. Cristina Zahonero (UFIEC)

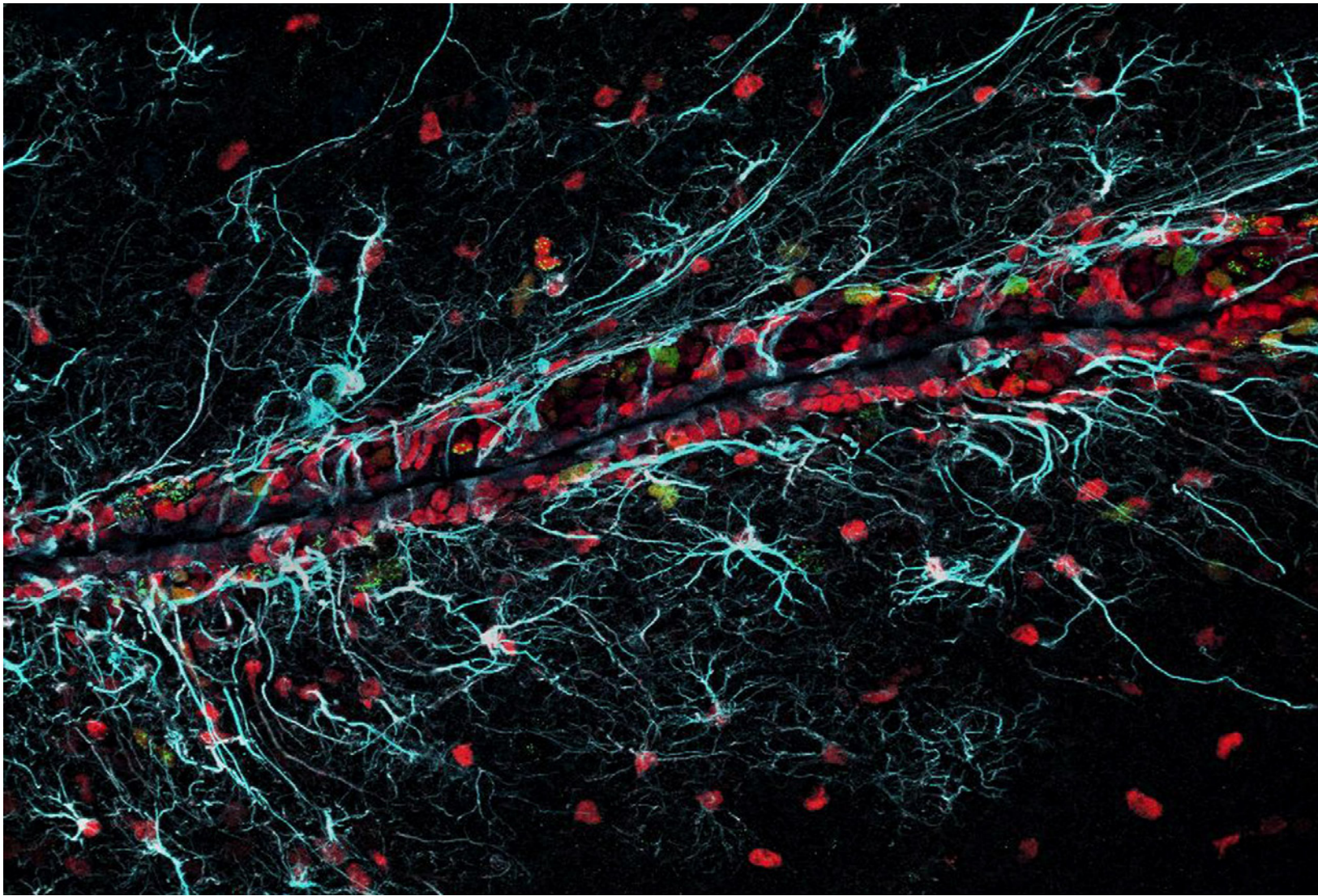
Esquema: Dr. Fernando González-Camacho (CNM)

Es el modelo experimental elegido especialmente en los campos de los trastornos inmunológicos, como pueden ser las enfermedades autoinmunes y la hipersensibilidad tardía o alergia, en oncología, o en infecciones experimentales por diferentes organismos, también se emplea en embriología, aunque en este campo está ganando terreno un animal de experimentación emergente como es el pez cebra, que ofrece otra serie de ventajas en este tipo de estudios.

La gran importancia de este animal al avance en el conocimiento de las enfermedades humanas radica en la disponibilidad que se tiene de manejar animales transgénicos, knock-out y cepas consanguíneas permitiendo el estudio in vivo de la función de determinados genes y su influencia en el desarrollo de las enfermedades de origen genético.

Imagen 39: Región SVZ (zona subventricular) del cerebro de ratón

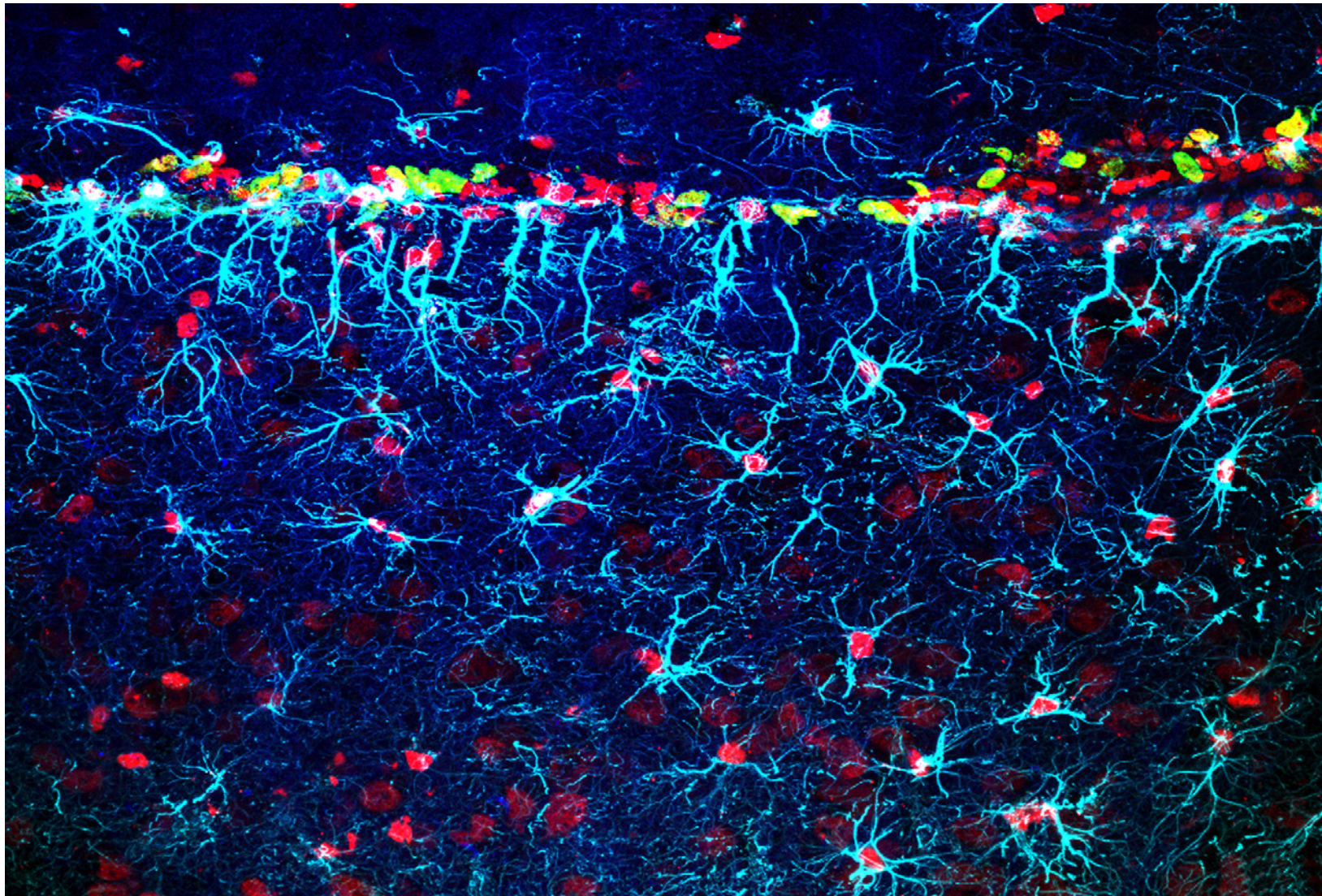
En rojo están marcados los núcleos, en cian los astrocitos.



Por cortesía de la Dra. Helena Mira y la Dra. María Díaz-Moreno (UFIEC)

Imagen 40: Región SVZ

En rojo se muestran los núcleos, en cian los astrocitos mediante el marcaje con GFAP, en verde-amarillo las células en proliferación (marcaje con BrdU).

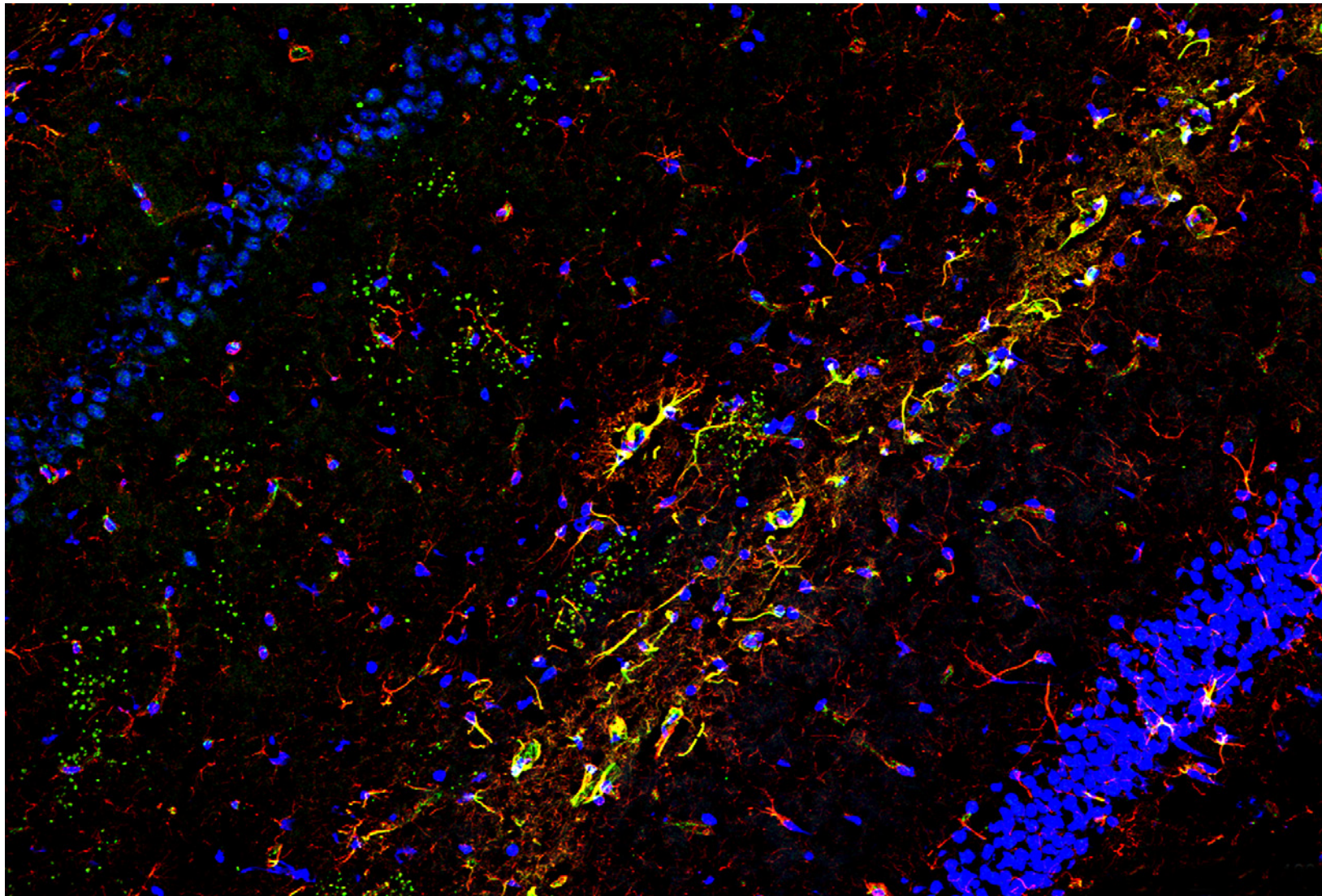


Por cortesía de la Dra. Helena Mira y la Dra. María Díaz-Moreno (UFIEC)

Imagen 41: Hipocampo del cerebro de ratón SAMP 8

Formación de placas en el cerebro asociadas a la edad

La cepa de ratones SAMP 8 forman parte del grupo de ratones que presentan senescencia acelerada. Esta cepa de ratón es considerada un modelo experimental en enfermedades neurodegenerativas como puede ser la enfermedad del Alzheimer por su envejecimiento prematuro, estos presentan marcadores específicos para esta enfermedad.

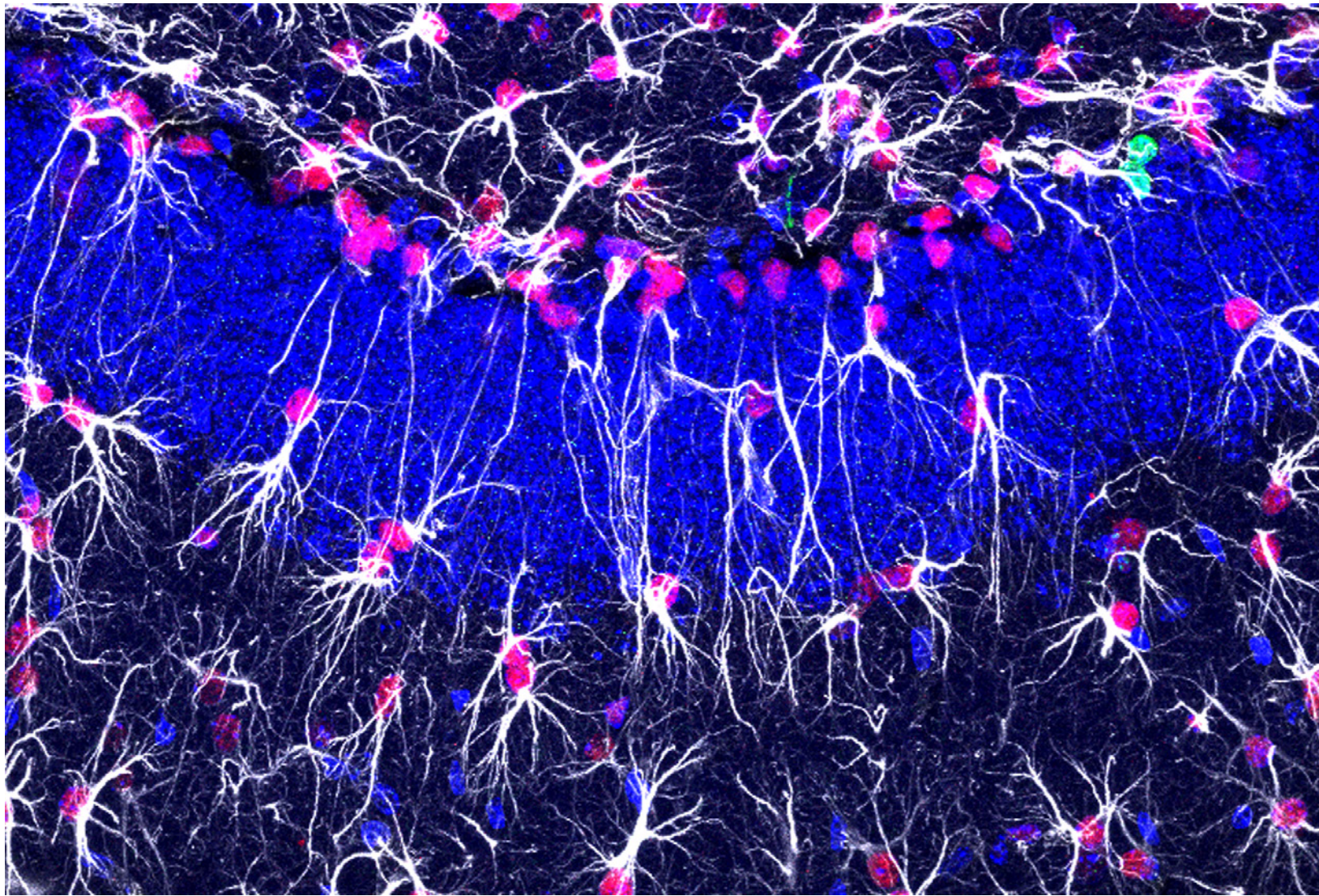


Por cortesía del Dr. Marçal Vilar y Sergio Hernández Latorre (UFIEC)

Imagen 42: Brazo del giro dentado del hipocampo

Buscando células madre en el cerebro

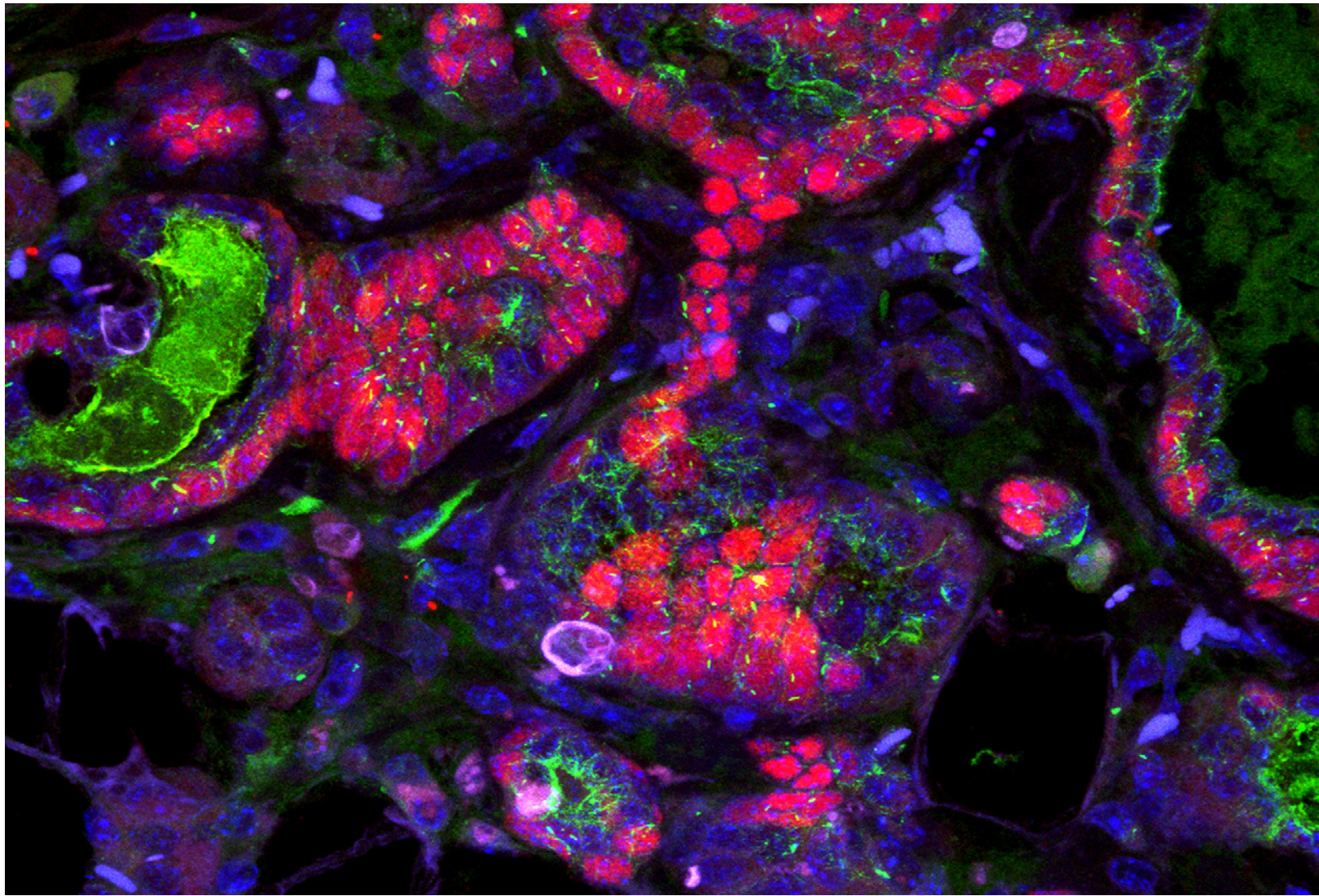
En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI, en blanco se marcan los astrocitos (marcaje GFAP), en rojo se marcan los núcleos de las células indiferenciadas (marcaje Sox2), en verde las células en proliferación (marcaje con BrdU).



Por cortesía de la Dra. Helena Mira y la Dra. Zoraida Andreu (UFIEC)

Imagen 43: Tejido de mama

Tejido mamario procedente de un modelo de ratón modificado genéticamente (knock-in) para el estudio de procesos de regulación genética.



Por cortesía de la Dra. Marta Gallego (UFIEC)

Imagen 44: Biopsia de piel humana

La piel es un órgano muy complejo, en él se están desarrollando métodos de diagnóstico para enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer mediante el estudio de alteraciones moleculares presentes en algunos de sus tipos celulares.

Capa externa en azul la córnea, del verde al rojo la epidermis, en azul la dermis. La imagen fue tomada con un objetivo plan apocromático 40x.



Por cortesía del Dr. Miguel Calero y la Dra. Alejandra Kun (UFIEC)

USUARIOS PARTICIPANTES

Este trabajo no habría sido posible sin mis usuarios. Me he dejado a mucho en el tintero porque solo he podido seleccionar imágenes representativas y bajo un criterio estético, sin entrar en sus contenidos científicos.

Aquí hago una relación de los grupos y personas que han traído al microscopio confocal sus muestras de las que hemos obtenido las imágenes.

Unidad de Encefalopatías espongiiformes

Miguel Calero
Alejandra Kun

Unidad de neuro-biología molecular

Helena Mira
María Díaz-Moreno
Zoraida Andreu

Unidad de neuro-oncología

Pilar Sánchez
Cristina Zahonero

Unidad de patología mitocondrial

Yolanda Campos
Rebeca Martín-Jiménez

Unidad de biología celular

José M.^a Rojas
Natalia Martínez
Carlota García Domínguez

Unidad de neuro-inflamación

Eva Cano
Elena Quintana Menendez
María del Carmen Serrano Pérez

Unidad de regeneración neural

Isabel Liste
Patricia Martínez-Morales

Unidad de neuro-degeneración

Marçal Vilar
Sergio Hernández Latorre

Unidad de tumores endocrinos

Antonio de la Vieja
Ana Chocarro-Calvo

Unidad de patología mamaria

Marta Gallego

Unidad de tumores sólidos infantiles

Javier Alonso
Florencia Cidre

Unidad de Biotecnología celular

Javier García Castro
Arantzazu Alfranca
Isabel Mirones
Vanessa Blanca
Ander Abarrategui

Unidad de terapias farmacológicas

Sonsoles Hortelano

Unidad de microscopía electrónica y confocal

Daniel Luque Buzo
Fernando González-Camacho
Silvia Hernández Esteban

Unidad de Inmunobiología

María Luisa Gaspar
Isabel Cortegano
Natalia Serrano
Carolina Ruiz

Inmunología Microbiana e Inmunogenética

Mercedes Domínguez
Inmaculada Moreno Iruela

Unidad de Inmunopatología del SIDA

Mayte Coiras

Unidad de Patología molecular del neumococo

Mónica Amblar
Paloma Acebo

Unidad de Virología molecular de rotavirus

Javier María Rodríguez

Servicio de Micología

Óscar Zaragoza
Rocío García-Roda
Ana Cecilia Mesa

Servicio de Bacteriología, Neumococos

José Yuste
Elisa Ramos-Sevillano

Servicio de Bacteriología, Legionella y Bordetella

Carmen Pelaz
Consuelo Elola Vega

Servicio de Parasitología

Unidad de diagnóstico y referencia de parasitosis

Esperanza Rodríguez de las Parras
Sonsoles Jiménez Sánchez