

ENSAYO DE FAGOCITOSIS DE MACRÓFAGOS PERITONEALES

SARA TORRES RUSILLO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR 3 E INMUNOLOGÍA

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA PRÁCTICA: El estudiante al terminar la practica de Conocer. O saber hacer

Estudio de la función principal del macrófago en la repuesta inmune innata y adaptativa:

- como células presentadoras de antígeno
- como fagocito.

METODOLOGÍA:

- Obtención de macrófagos peritoneales de ratón.
- Ensayo de fagocitosis con bolitas de látex.

MATERIAL:

1. Ratones.
2. Agujas y jeringas
3. Alcohol 96°
4. Tijeras
5. PBS
6. Medio RPMI
7. Cámaras Chamber Slides
8. Micropipetas 20, 200 y 1000µl y puntas
9. Cubetas de tinción
10. Fijador, soluciones de tinción hematoxilina/eosina
11. Agua destilada
12. Incubador de CO2
13. Cámaras de recuento celular
14. Cubreobjetos
15. Solución de montaje
16. Microscopios
17. Látex

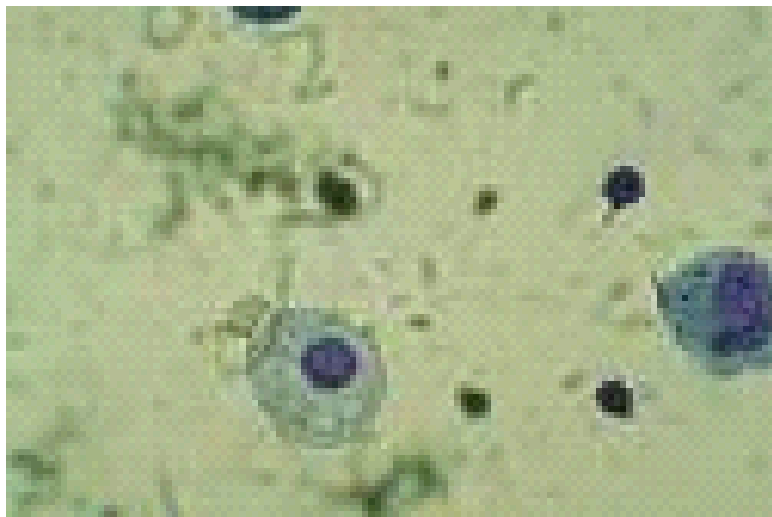


Cámaras Chamber Slides

PROTOCOLO:

1. Sacrificar al ratón mediante dislocación cervical. Para ello situamos una mano sobre la nuca del animal y con la otra tiramos del rabo hacia atrás mientras se presiona la nuca hacia abajo. **foto**
2. Colocar al ratón de espaldas sobre un papel de filtro. **foto**
3. Hacer un pequeño corte en la piel del ratón con las tijeras a la altura del abdomen.
4. Retirar la piel con los dedos.
5. Obtener la población celular del peritoneo mediante lavado de la cavidad con medio completo (5ml de RPMI) y masaje peritoneal.

6. Ajustar la población obtenida a 500.000 céls/ml. (en prácticas 1×10^6 céls/ ml)
7. Sembrar en cámara Chamber Slides, 100 μ l/ pocillo.
8. Incubar durante dos horas a 37°C y 5% de CO₂, para permitir la adherencia de los macrófagos (en prácticas 30 minutos)
9. Lavar los pocillos con PBS a temperatura ambiente
10. Añadir 200 μ l/ pocillo de medio RPMI a 37°C
11. De una solución de partículas de látex al 1% en PBS, añadir 20 μ l/ pocillo y dejar incubando a 37°C y 5% de CO₂, durante dos horas (en prácticas 30 minutos)
12. Retirar las celdillas de la placa y lavar el exceso de bolitas de látex con PBS
13. Fijar las células con metanol durante 5 minutos
14. Teñir los portaobjetos con colorante acidófilo (teñirá el núcleo de color rojo) y basófilo (teñirá el citoplasma de azul), introduciendo de 6-8 veces en cada colorante.
15. Lavar extensamente con agua destilada
16. Montar la preparación con el cubre y dejar secar durante 10 minutos
17. Observar al microscopio.



Macrófagos teñidos con hematoxilina/eosina.