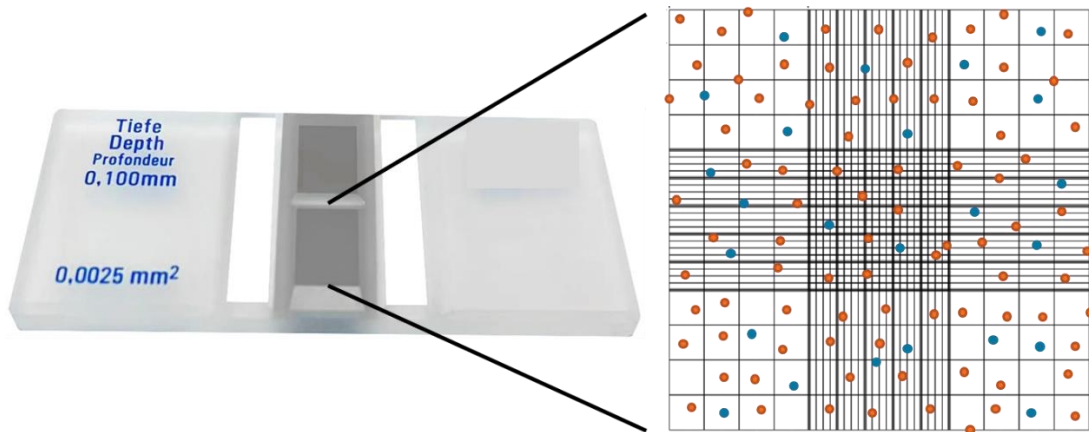


SUPUESTO 1

A la Unidad de Cultivos Celulares se le solicita que continúe con un cultivo de células HELA y compruebe la viabilidad de estas, tras el tratamiento con un compuesto "X" supuestamente tóxico para ellas, mediante un ensayo de MTT.

Responda a las siguientes cuestiones:

- Describa brevemente los pasos esenciales para hacer una división del cultivo y sembrar las células necesarias para realizar el experimento solicitado en una placa de 24 pocillos, indicando los reactivos necesarios y para qué se utilizan (2,5 puntos).
- Tras obtener la suspensión celular, se diluye un pequeño volumen de esta con azul de tripano a una dilución 1:1 y se procede a su contaje en un hemocitómetro, observándose esta imagen en el microscopio:

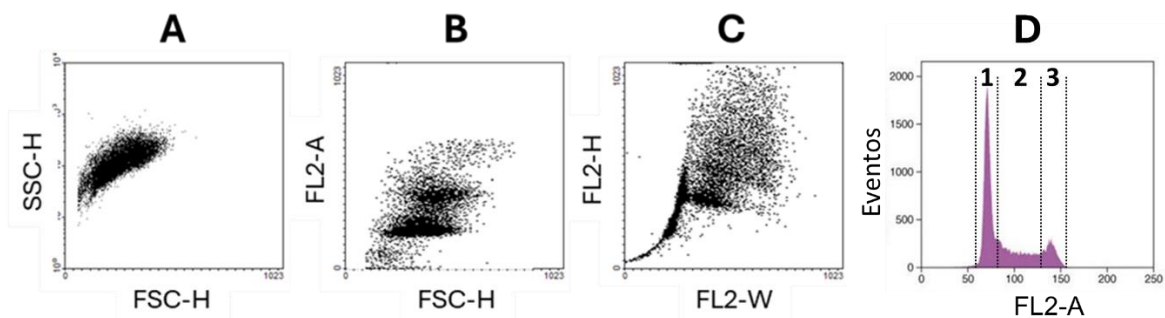


- Indique el número de células viables por mililitro que ha obtenido si en cada cuadrante hay 3 células marcadas con azul tripano (1,25 puntos).
 - Explique qué pasos seguiría para sembrar la placa p24 con 4.500 células por pocillo en un volumen total de 0,5 mL/pocillo (1,25 puntos).
- Indique como diseñaría una placa de 24 pocillos (p24), si se quieren testar 7 concentraciones diferentes del compuesto "X" por triplicado (2,5 puntos).
- Una vez finalizados los tiempos de tratamiento, describa los pasos para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT e indique cómo la calcularía para las diferentes concentraciones del punto anterior (2,5 puntos).

SUPUESTO 2

En una Unidad de Cultivos Celulares se solicita evaluar las diferentes fases del ciclo celular de la línea K562 que crece en suspensión mediante citometría de flujo, utilizando un agente intercalante.

- a) Explique brevemente el protocolo que se realizaría para medir las fases del ciclo celular partiendo de una placa p100 hasta el momento de su adquisición en el citómetro de flujo (3 puntos).
- b) Una vez adquiridas las muestras en el citómetro se obtienen los siguientes gráficos de puntos (dot plot) e histograma:

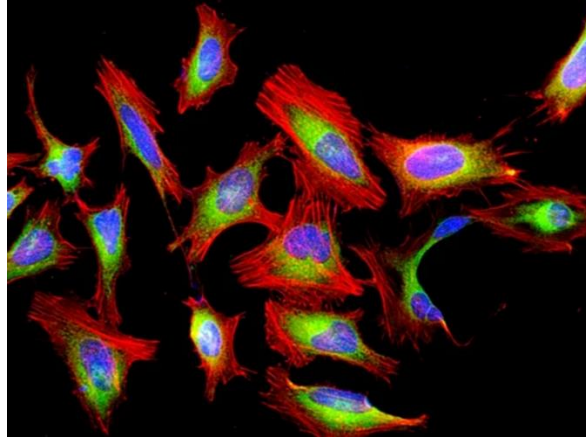


Responda razonadamente a las siguientes cuestiones:

- b.1.) Indique qué parámetro representa cada uno de los ejes de los distintos gráficos de puntos (dot plot) A, B y C (2 puntos).
- b.2.) Una vez obtenidos los gráficos de puntos (dot plot) A, B y C, describa brevemente como llevaría a cabo el análisis de los datos en ellos para obtener el histograma D (3 puntos).
- b.3.) Indique a qué molécula se refiere FL2-A en el histograma D y qué representan las regiones 1, 2 y 3 (2 puntos).

SUPUESTO 3

Un investigador solicita el estudio mediante microscopía confocal de una muestra de células en las que ha marcado, mediante técnicas inmunocitoquímicas, el citoesqueleto, el retículo endoplasmático y el núcleo celular. Tras la visualización al microscopio se observa la siguiente imagen:



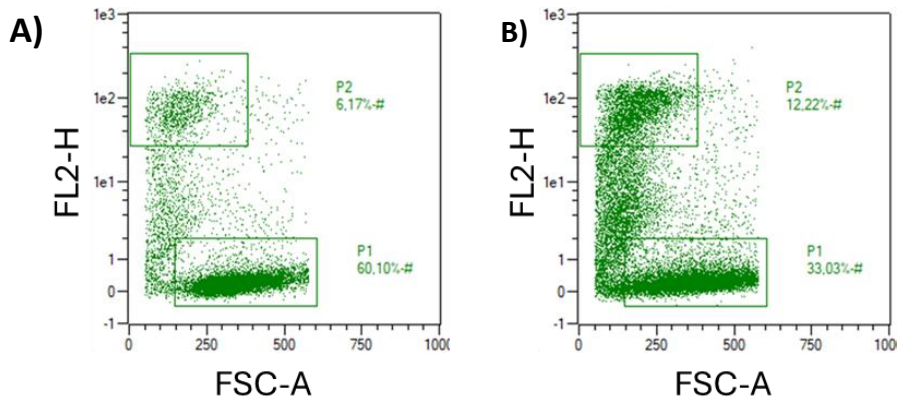
Responda a las siguientes cuestiones:

- a) Describa brevemente qué procedimiento específico para este tipo de experimentos se debe seguir para sembrar las células en una placa p35 a partir de un frasco de mantenimiento (2,5 puntos).
- b) Describa la secuencia correcta de pasos que se deben seguir en el marcaje y preparación de la muestra para su observación en el microscopio (2,5 puntos).
- c) Teniendo en cuenta que el citoesqueleto está marcado en rojo, el retículo endoplasmático en verde y el núcleo en azul, indique para cada una de estas estructuras qué tipo de sondas o marcadores usaría y qué láser se debe utilizar para visualizar cada una de ellas (2,5 puntos).
- d) El investigador solicita que se muestren imágenes de un apilamiento en z (*z-stack*). Indique brevemente en qué se basa y cómo se haría dicho apilamiento (2,5 puntos).

SUPUESTO 4

En una Unidad de Cultivos Celulares se puede determinar la viabilidad celular mediante distintas técnicas de citometría de flujo.

- a) Una de las técnicas utiliza un marcaje directo de las células con yoduro de propidio, obteniéndose las siguientes gráficas:

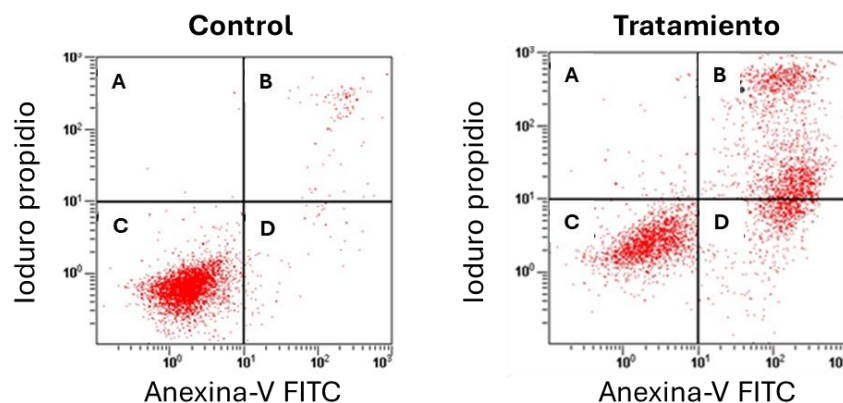


a.1.) ¿Qué representan los ejes de abscisas (FSC-A) y de ordenadas (FL2-H) de las gráficas A y B? (1,25 puntos).

a.2.) Indique cómo se diseñaría la plantilla de gráficos a la hora de adquirir las células en el citómetro para obtener estas gráficas (2,5 puntos).

a.3.) Explique cuál de las dos gráficas (A o B) muestra una población con mayor muerte celular (1,25 puntos).

b) Otra de las técnicas de citometría de flujo para determinar la viabilidad celular y el tipo de muerte que se produce en células tratadas con un compuesto supuestamente tóxico es realizar un doble marcaje con yoduro de propidio y Anexina-V. Tras realizar un experimento se obtienen los siguientes resultados:



Responda razonadamente a las siguientes cuestiones:

b.1.) Describa para qué se utiliza el yoduro de propidio y la Anexina-V FITC, indicando con qué detector se visualiza cada uno de ellos (2,5 puntos).

b.2.) Explique a qué se corresponde cada uno de los cuadrantes A, B, C y D de cada uno de los gráficos (2,5 puntos).