

# 1. Material biologikoen prestakuntza eta bere behaketa mikroskopioan

## 1. Mikroskopia fotonikoa

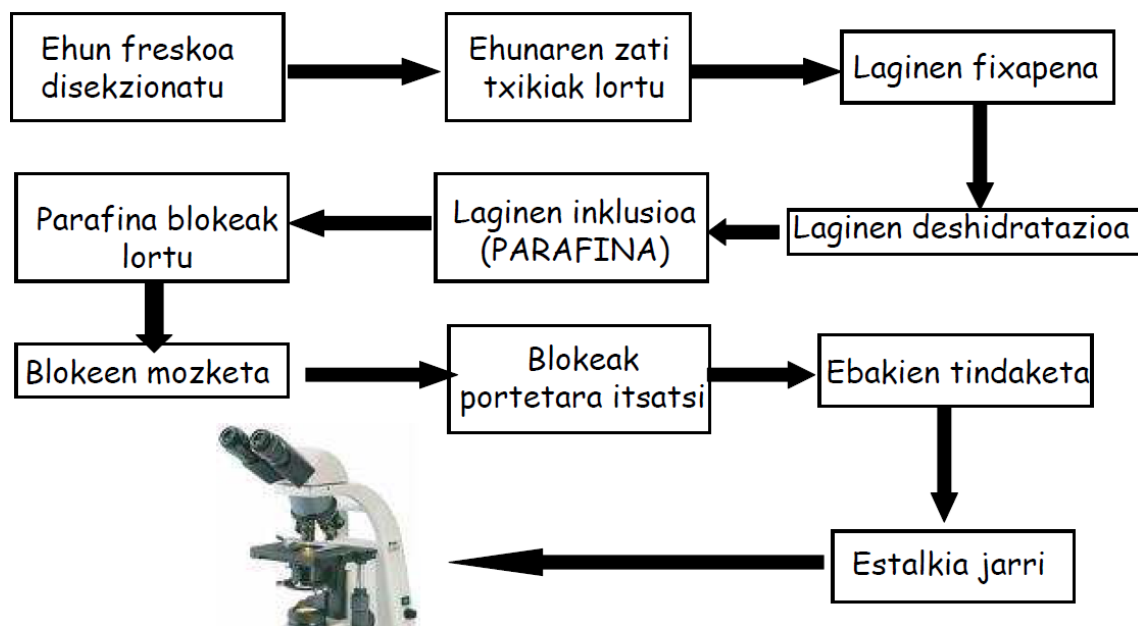
### 1.1 Sarrera

Gertakuntza histologikoa, lagin biologiko bat disezzionatzen dugun momentutik mikroskopioan begiratzen dugunera arteko prozesua da.

Prozesu honen helburua interesekoa zaigun lagin horren xafla egonkor, fin eta kontrastatuak lortzea da; organoek, ehunek etab.ek egoera normalean daudenean dituzten zelulen egiturak ahalik eta hobekien isladatzea.

Baina, lagin hori behar bezala prestatzen ez bada, **arazoak** sortzen dira; adibidez, heterolisia, autoliseriketa entzimatiakoak (gaizki fixatzearen ondorioz, entzimek lanean jarraitu baitezakete), aldaketa osmotikoak, eaporazioak (zelulak txikitu), eta hainbat bakterioek lagina kutsa dezakete ustelduz. Ondorioz, aztertu beharrekoa hondatzen da.

- Mikroskopia fotonikorako (argi mikroskopioa) honako prestakuntza prozesu hau jarraitu behar da:



### 1.2 Fixapena

Prozesu osoko momenturik garrantzitsuenetakoa da, pauso hau gaizki eginez gero, hemendik aurrerako guztia gaizki joango baita.

Lagin biologikoaren *post mortem* usteldura ekiditeko tratamendua da. Lagina ondo fixatuz gero errealitatearen “argazki” on bat lortzen da; mikroskopiotik begiratzuz gero, organo horrek juxtu hildako momentuan zuen itxura mantentzea lortzen baita.

Helburuak:

- Lagina bakterioen edo autolisi bidez sortutako erasoetatik babestea

- Laginaren egiturak egonkortzea
- Laginak ondoren jasango dituen prozesuetatik babestea
- Xafla gardenak lortzeko gotormena (sendotasuna) ematea
- Laginaren koloregarritasuna handiagotzea

Arazoa: Uraren eliminazioa → ura azkar atertzen bada, osmosi prozesuak

#### Metodoak:

- Fisikoak:
  - Ebaporazioa: metodo honen ondorioz, ordea, zelularen medio gehiena urez osatuta dagoenez, hau ebaporatzean, zelularen azaleraren aldaketa gertatzen da, eta ondorioz, zelula uzurtzen da. Oso ehun puntualetan.
  - Izozketa: lagina izozteko denbora jakin bat behar da. Horregatik, bitarte horretan autolisiren bat gerta daiteke. Hori saihesteko, lagina nitrogeno likidoan sartzen da. Hau – 195,8°C-tan dagoenez, lagina bat-batean izozten da.  
Arazoa: zelularen gehiengoa urez osatuta dagoenez, lagina izoztean ur hori izotz kristaletan bihurtzen dela, eta solidoak likidoak baino bolumen gehiago okupatzen duenez, barneko egiturak, zenbait mintz egitura adibidez, apurtu egiten dira.
  - Liofilazioa: metodo honekin lagina berehala izozten da, eta ondoren, presiopean izotzaren sublimazioa eragiten da. Aparatu berezi eta garesti bat behar da prozesu hau burutzeko.
  - Ordezkapena: ordezkapen klasikoena, lagina izoztu ondoren sortutako izotz-kristalak alkoholagatik ordezkatzea da. Baina beste ordezkapen erabili bat CO<sub>2</sub>rena da. Lagina izoztu ondoren CO<sub>2</sub>an sartzen da izotz-kristal horien ordez, eta gero hau oso erraz sublima daiteke.
- Kimikoak:

Metodo kimikoak fisikoak baino erabiliagoak dira. Erreakzio kimikoen bitartez gure zeluletako egiturak eta prozesuak gerarazten ditugu. Bi mota daude: sinpleak (lagina zuzenean sartzen da, alkohola, azido azetiko... ) eta konposatuak (sinpleen nahasketak, lagina sartu eta jarraian fixatu).

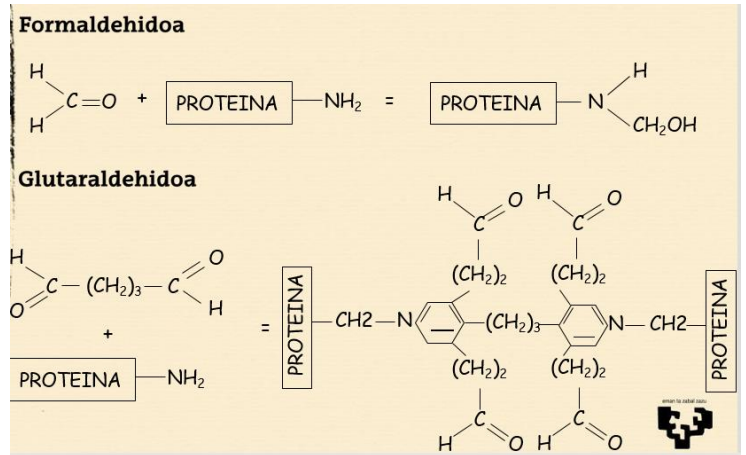
<b>Sinpleak</b>	<b>Konposatuak</b>
Etanola	Carnoy
Azido azetiko	Bouin
Azido trikloroazetiko	Bouin alkoholikoa
Azido pikrikoa	Ciaccio
Merkurio kloruroa	Baker
Kromio konposatuak	Davidson
Formaldehidoa	
Glutaraldehidoa	
Osmio tetroxidoa	

- Formaldehidoa (4°C): konposatu gehienaren osagaia. Garestia. Proteinen NH<sub>2</sub> taldearekin erreakzionatu eta hemen lotzen da. Proteinak estuki lotu eta blokeatuta geratzen dira. Ezin dituzte prozesuak aurrera eramanez, ez dira usteltzen eta egitura zelularrak mantentzen dira, ez dira mugitzen. Tamainaz ez da hain handia, sarkortasun handiagoa, lagin handiagoa fixatu.
- Glutaraldehidoa: oso toxikoa, garestia. Proteinekin zenbait elkarrekintza izaten ditu. Hauek haien artean estuki lotzen ditu. Oso lotura sendoak dira eta formaldehidoarekin baino fixapen

hobea lortzen da. Zelularen funtzioak paralizatzen dira eta lagina fixatuta mantentzen da. Tamainaz handia da eta proteinen artetik pasatzeko zailtasunak dituenek, bere sarkortasuna mugatua da. Hala ere, fixapena egonkorragoa izango da.

Geruzaz geruza fixatuz doa, baina laginaren erdira sartu ezin bada, hori autolisia emango da eta usteldu. Lagin txikiak hobeto fixatzen ditu.

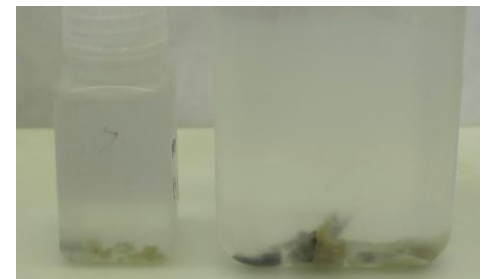
- Biak batera ere erabili daitezke: formaldehidoa oso azkar helduko da laginaren erdirarte eta glutaraldehidoak ingurukoa finkatuko du. Horrela lana optimizatu.
- Azido azetiko oso azkar sartu, txikia eta arin fixatu. Hau, beti ere, ehunaren arabera izango da, zelulak oso lotuta badaude, sarkortasuna txikiagotuz.
- Osmio teroxidoak lipidoak lotzen ditu estuki egitura lipidikoak egonkortuz. Mikroskopia elektronikoan behatuko diren laginetan erabiltzen da. oso molekula handia da. Beraz, erreaktibo honek efizientzia handiagoa izan dezan, lagin txikiekin erabiltzen da, eta horrela denbora ematen dio honen zentroraino iristeko.



### Fixapen motak:

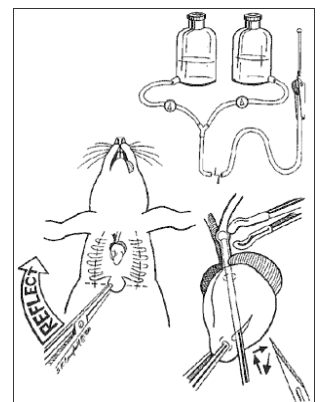
- Inmersioa: lagina fixatzailean murgiltzen da. Fixatzaileak lagineko ura ordezkatuko du. Horretarako, fixatzailearen bolumena laginaren bolumena baino 8-10 aldiz handiagoa izan behar da gutxienez; ahal den neurrian laginaren parterik handiena jarri behar da kontaktuan fixatzailearekin.

Askotan hobea da lagin gutxi eta fixatzaile asko jartzea lagin asko jarri ordez. Izan ere, laginek ura askatzen dute eta fixatzaile+ura nahaste honetan zenbait bakterio, onddo... sor daitezke gure lagina kutsatuz edo fixatzailea uretan diluitzea gerta liteke.



Egon daitekeen beste arazoetako bat zera da; fixatzaile gutxi eta lagin handiegia erabiltzea. Kasu hauetan, fixatzailea lagin osoan barneratzera iristen ez denez, benetan ondo fixatutako ingura ertzetan kokatzen da; hori baino erdiragoko ehun zatiak ez dira ondo fixatuta geratzen eta erdialdean ez da ezer agertzen. Ondorioz, laginaren erdialdea ustelduz doa.

- Perfusioa: modu honekin, organismoa bizirik dagoela fixatzailea sartzen zaio zuzenean bihotzean, eta orduan, organismoak odola ponpatzen duenean, fixatzailea ere ponpatzen du zainetan zehar. Modu hau organismoa golpetik hiltzea baino eraginkorragoa da, izan ere, golpetik hiltzean gure intereseko organoa bilatzerako eta hau fixatzerako denbora asko pasa liteke, eta bitarte horretan agian usteldu daiteke.



Perfusion Setup Diagram

Ohiko fixatzaileak:

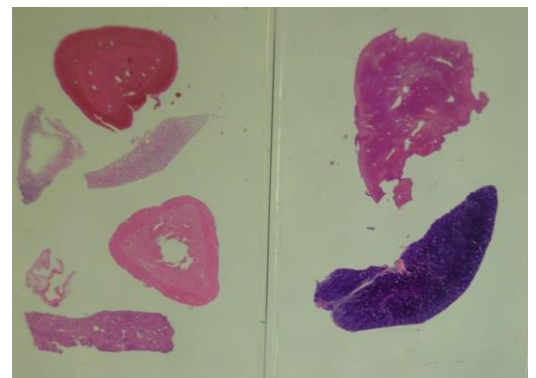
- **Bouin** (24-32 h, 4°C)
  - Gluzidoetarako
  - Azido pikrikoaren disoluzioa urtsua (saturatua) 75mL
  - Formaldehidoa 20mL
  - Azido azetiko 5mL
- **Ciaccio** (>7 egun, giro tenperatura)
  - Lipidoak eta katabolismo proteikoko ekoizkinak
  - Bikromato potasiko disol. Urtsua (%5) 80mL
  - Formaldehido 15mL
  - Azido azetiko 5mL
  - 12h + garbitu BP %3 + postkromatu BP %3 5 egun
- **Carnoy** (1-2h)
  - Proteinak
  - Alkohol absolutoa 60mL
  - Kloroformoa 30mL
  - Azido azetiko 10mL
- **Davidson** (24-48h)
  - Proteinak
  - Formaldehidoa 200mL
  - Azido azetiko 100mL
  - Glizerina 100mL
  - Etanola 300mL
  - Ur isotonikoa (NaCl) 300mL

Ahal den neurrian, ahalik eta laginaren parte handiena jarri kontaktuan fixatzailearekin. Tindaketa txarto agertu bada, horren arrazoia fixapena txarto egin izana izan daiteke. Tindaketa intentsitate desberdina erakusten duten zenbait gune egongo dira, ertzetan egokien tindatutako gunea. Honen arrazoia erdigunea fixatu gabe dagoela da.

Fixapena ondo gertatzeko kontuan hartu behar diren beste zenbait **faktore**:

- pHa
- Tenperatura: molekulen eta fixatzailearen arteko erreakzionagarritasuna desberdina da T bakoitzean. Adibidez, tenperatura jaitsiz gero, fixapena hobe lortuko litzateke, ehunaren jardura gutxituko zelako. Baina, aldi berean, denbora gehiago beharko da fixapena gertatzeko. Fixatzaile bakoitzak bere tenperatura optimoa.
- Sarkortasuna
- Osmolaritatea
- Kontzentrazioa
- Denbora

### 1.3 Post fixapena





Lagina ondo fixatu arren, badira zenbait ehun berezi post-fixapena izeneko prozesu batekin tratatu behar direnak, adibidez, larruazala, muskulua, begia, hezurra, kartilagoa... Izan ere, lagin gogorregiak direnez, bigundu egin behar dira, gero ebaki ahal izateko.

Horretarako, ehun hauek **dekaltzifikatu** egin behar dira. Hainbat prozedura daude:

- %10 den azido formikoa erabili daiteke 2-5 egunez
- EDTA errektiboa gehitu dakieke zenbait astez

Hauen kontzentrazioa eta denbora laginaren araberakoak izango dira. Horrela, lagin hauek pixka bat desagiten dira,  $Ca^{2+}$  kentzen zaie laginei, eta ondoren berriz fixatzen dira. Dena den, kontuan hartu behar da azidoetan oinarritutako disoluzioek tindaketa txarra eman dezaketela, izan ere ehunak kaltetu ditzakete. Horregatik, prozedura honekin ehun gogorrak soilik tratatzea komeni da, prozedura espezifikoa.

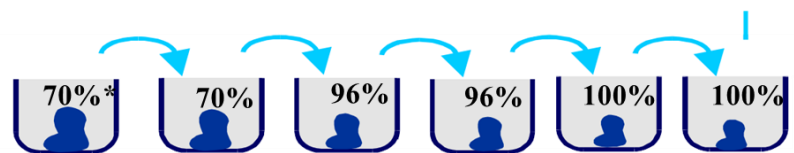
#### 1.4 Deshidratazioa

Lagin biologikoak, normalean oso bigunak izaten dira. Mikroskopia behatzeko laginaren xaflak, oso meheak izan behar dutenez, lehenik eta behin gogortasuna eman behar zaio laginari. Horretarako, laginari parafina sartzen zaio. Baina, lagin biologikoak urez beteta daude, eta parafina ez da urarekin inolaz ere nahasten.

Beraz, lehenik, lagina **deshidratatu**

behar da: Lehenik, urarekin (ur hau jada fixatzaileak ordezkatu du) nahasten diren disolbatzaileak

erabiltzen dira; alkohola, azetona... Lagina, disolbatzaile horien kontzentrazio desberdineko ontzietan murgiltzen da, eta horrela, pixkanaka ura alkohol /azetonagatik ordezkatzuz doa. Bakoitzeko bi ontzi jartzen dira, ziurtatzeko. Azkeneko ontziko kontzentrazioa %100 disolbatzailearena izango da. Horrela, lagina deshidratatzea lortzen da. Lagina ondo fixatuta dagoela suposatzen denez, ez litzateke inongo erreakzio osmotiko edo antzekorik gertatu beharko.



Alkohola erabili beharrean, azetona erabiltzen bada, tenperatura baxuetan fixapen hobea lortuko da.

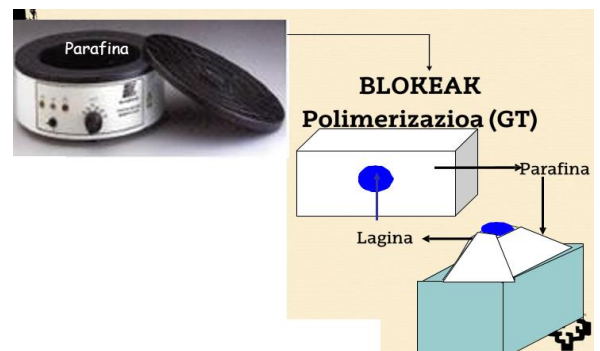
#### 1.5 Garbiketa

Agente deshidratatzaile gehienak (alkohola, azetona...) ez dira parafinarekin ondo disolbatzen, beraz, bitartekari bat behar izaten da. Bitartekariak, normalean, hidrokarburoen eratorriak izaten dira:

**bentzenoa, xilenoa, toluenoa, kloroformoa...** Konposatu hauek ondo disolbatzen dira bai alkohol /azetonarekin, zein parafinarekin. Alkohol /azetona bentzenoan sartzeko prozesuari clearing deitzen zaio (aklaramendua).

#### 1.6 Inklusioa

Orain, lagina, parafina likidoaren medio batean sartzen da (horretarako, parafina berotu egin behar da 60-65 °C-tan 4 orduz), eta parafinak, bentzeno eta konposatu horien lekua hartzen du. Parafina hoztean solido bihurtzen da eta parafina blokeak lortzen dira, blokeak polimerizatzen dira. Bloke hauetatik, jada erraza da xafla meheak lortzea. Laginaren barruan ere parafina.



Erretxina sintetikoak ere erabili daitezke. Bere berotze tenperatura eta denbora erretxina motaren arabera izango da.

### 1.7 Mozketa

Laginaren xafla meheak mozteko erabiltzen den makina, **mikrotomoa** da. 3-7 $\mu$ m-ko ebaki uniformeak lortzen dira, tungstenoa edo altzairuzko aihotzaren bidez.

Lagina gogorragoa bada, 15-20 $\mu$ m-ko ebakiak egiten dira.

Behin xaflak lortuta, ebaki hauek ur bainu bero batean sartzen dira (40-45°C). Horrela, parafina zabaldu egiten da, honen tolesturak saihestuz. Ondoren, ebaki hauek, beirazko portetara pasatzen dira (normalean, albumina izeneko pegamentu berezi batekin tratatuta egoten dira). Porta ur bainuan sartu eta “goilare” batek bezala, lagina hartzen du.



Porta berotzen jarriko da, ura lurrundu eta lagina guztiz portara itsatsita geratuko da. Lagina txarto fixatuta badado, ez da ondo zabalduko eta ez da ezer ikusiko.

### 1.8 Irudi kontrastea

Helburua laginaren kontrastea handitzea da, izan ere, hauek ez dute kolorerik oso xerra finak direnean. Prozesu honetan erabiltzen diren tindatzaileak jatorri naturalekoak, kimikoak... izan daitezke. Lagina batzuetan asko tindatzen da eta gero ez da ezer ikusten.

Tindatzaileak erreaktibo kimikoak dira, kualifikazioa (ezaugarri eta izaera kimikoa) eta kuantifikazioa eskaintzen dituztenak.

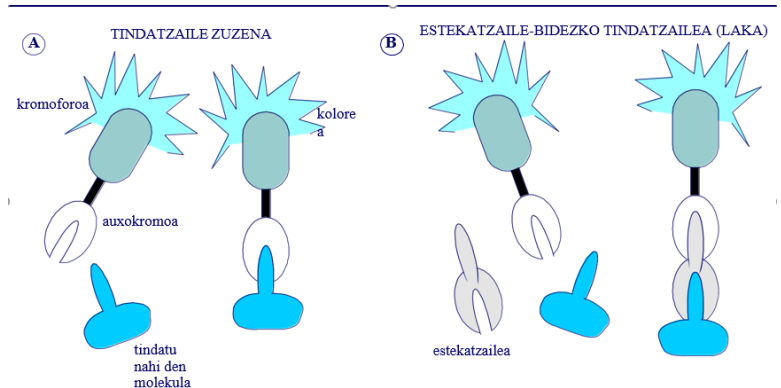
Inpregnazioa egitean, aldiz, konposatu metalikoak erabiltzen dira, kualifikazioa soilik eskaintzen dutenak. Metal astunetan jartzen da lagina, metalak xurgatu eta kolore iluna ematen dio, horrela egiturak identifikatu. Hezurretan adibidez, zilar inpregnazioa.

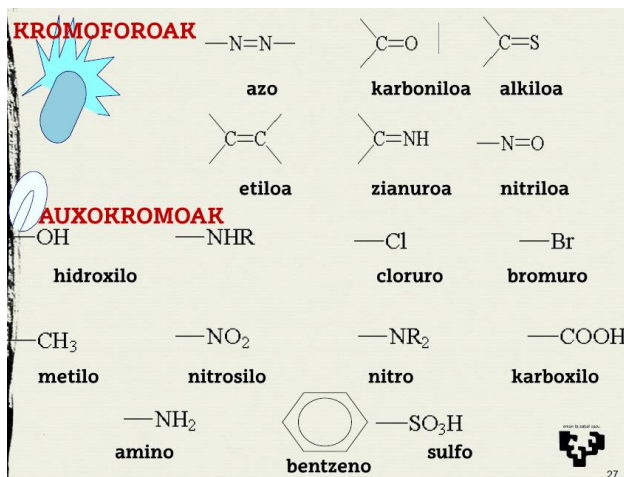
Tindaketa mota desberdinak erabiltzen dira:

- Zuzenak
- Estekatzaileen bidezkoak (alunbreak, taninoak...)
- Topografikoak, histokimikoak, entzimak, inmunohistokimika

Tindatzailea, molekula konplexu eta handia da eta bi atal izaten ditu: **kromoforoa** (ioi desberdinez osatuta, kolorea ematen duten talde kimikoak eta honen bidez mikroskopioan ikusi) eta **auxokromoa** (ehunarekin lotzen dena, sustratu tindagarriekiko tindatzailearen elkargarritasunaren erantzulea, hau osatzen duten molekulak aldatzen dira tindatu nahi den molekula taldearen arabera).

Batzuetan auxokromoa, ez da zuenean ehunarekin lotzen, lagina estekatzailea duen disoluzio batean murgilduta egongo da, eta hau izango da ehunarekin lotuko dena. Ondoren, tindatzailean murgiltzean, auxokromoa estekatzaileari lotu eta kromoforoak kolorea emango du.

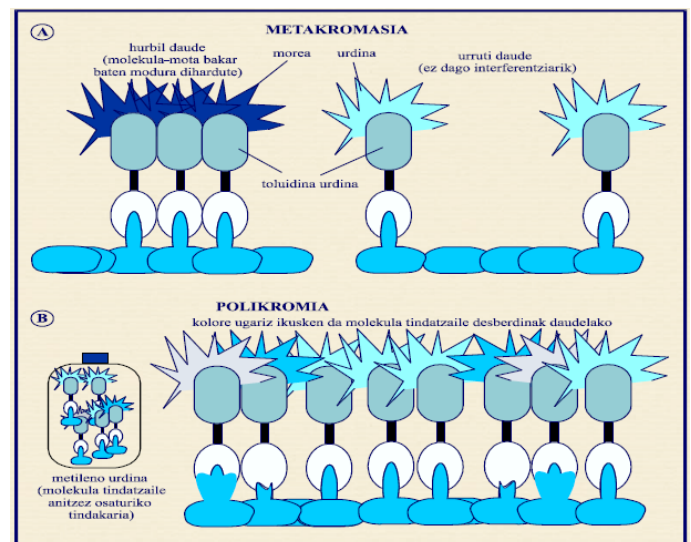




Kromoforoek lotura bikoitza dute. Fotoiek hauekin erreakzionatu eta kolorea eman. Uhin luzera desberdinak, kolore desberdinak.

Zenbait tindatzailek erantzun bereziak eman ditzakete. Bi kasu mota bereiz ditzakegu:

- **Metakromasia:** tindatzaile batek kolore desberdinak adierazten ditu egoera bakoitzaren arabera. Adibidez, **toluidina urdina** tindatzailearen kasuan, honen kromoforoak elkarrengandik hurbil daudenean molekula bakar baten modura jarduten du eta kolore morea ematen du; aldiz, kromoforoak elkarrengandik urrun daudenean, interferentziarik ez dagoenez, kolore urdina ematen du.
- **Polikromia:** tindatzaile berdinak kromoforo desberdinak izaten ditu. Ondorioz tindatzaile honen pote komertzialetik kolore desberdinak eskura ditzakegu. Metileno urdinaren kasuan, kromoforo desberdinak daude eta kolore askotan ikusten dugu, gorria, urdina...



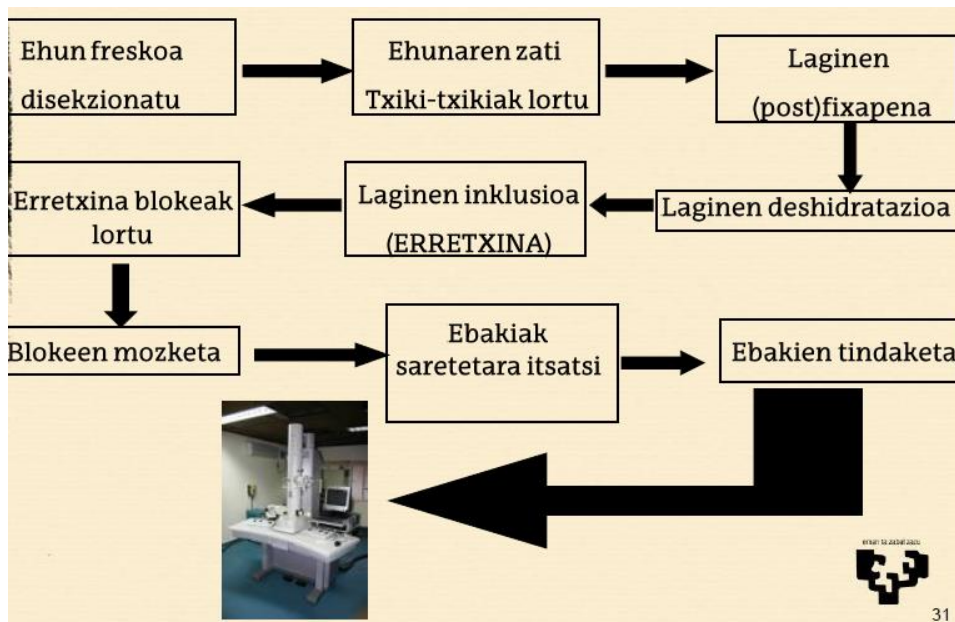
## 2. Mikroskopia Elektronikoa

### 2.1 Sarrera

Mikroskopia elektronikorako honako prestakuntza prozesu hau jarraitu behar da:

Mikroskopia elektronikoan erabiltzen diren laginak, oraindik ere finago eta txikiagoak dira. Orokorrean gertakuntza zitohistologikoaren prestakuntza argi mikroskopiokoaren antzekoa da, baina baditu zenbait desberdintasun:

- Lortzen diren ehunaren zatiak askoz ere txikiagoak dira.
- Azetona erabiltzen da deshidratatzeko
- Laginak erretxinan sartzen dira, parafinan sartu beharrean. Hau askoz gogorragoa da eta 80-90nm-ko zatiak eskuratzen dira.



## 2.2 Fixapena

Laginen fixapena, glutaraldehidoa erabiliz egiten da, batez ere. Sarkortasun txikia izan arren, ehuna hain txikia izanik, hau ez da muga bat. Fixatzailearen bolumena laginarena baino 8 aldiz handiagoa izan behar da.

## 2.3 Post fixapena

Post-fixapena ere lagin guztiei aplikatzen zaie. Hau osmio tetroxidoarekin egiten da. lagina osmioan sartzen da, baina hau oso toxikoa da. Honen bidez, lipidoak fixatzen dira. Alkoholaren bidez deshidratazioan, lipidoak disolbatzen dira eta argi mikroskopioan egitura mantentzen da baina zuri ikusten da. Aldiz, hemen lipidoa osmioarekin lotuta dagoenez, ez da disolbatzen.

Osmioa ez da argi mikroskopioan erabiltzen, oso toxikoa delako eta bere sarkortasuna mugatua. Lipidoak aztertu nahi badira solik erabili. Askotan erabilgarriagoa izaten da izoztea.

## 2.4 Deshidratazioa

%50-eko gradua duen alkoiletik hasita egiten da, ahalik eta ondoen deshidratatzeko. Azetona ere erabili daiteke.

## 2.5 Garbiketa

Toluenoa edo xilenoa erabiltzen da deshidratutako lagina erretxinarekin gogortu baino lehen, baina ez da guzti beharrezkoa, alkohola zein azetona erretxinarekin ondo konpontzen baitira.

## 2.6 Inklusioa

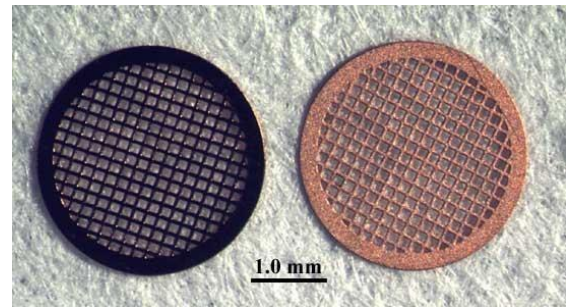
Laginen inklusioa erretxinan egiten da. Honek, laginaren askoz ere ebaki finagoak lortzea ahalbidetzen du. Lagina kapsuletan jartzen da. Erretxina, likido berezi moduan erosten da, bi-hiru likidoren arteko nahasketa da. Hau, alkohol /azetonarekin oso ondo nahasten da (ezta clearing-ik behar). Beraz, ura alkohol /azetonagatik ordezkutzen da, eta ondoren, hau, erretxinagatik. Ondoren, erretxina solidotzeko, argi ultramorearen azpian edo tenperatura altuetan jartzen da, eta erretxina gogorra geratzen da bloke solidoak eratuz.





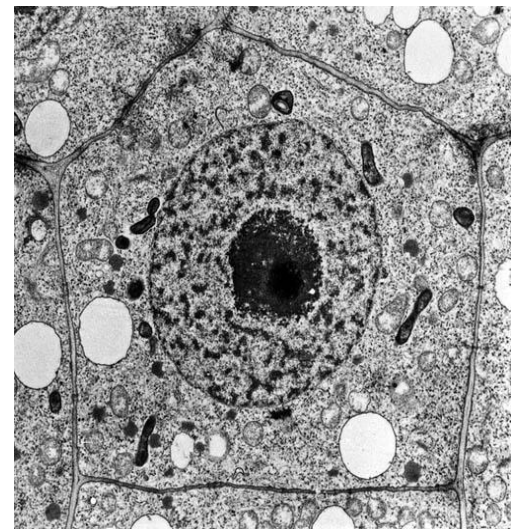
## 2.7 Mozketa

Lortutako erretxina blokeen mozketak ultramikrotomoa erabiliz egiten dira, eta 80-100nm-tako ebakiak lortzen dira, oso xerra finak. Erabiltzen diren aihotzak beirazkoak edo diamantezkoak dira. Ondoren, ebakiak ez dira portetan itsasten, sare berezi batzuetara itsasten dira. Sare hauek, Cu, Ni, Al, Au ... -z osatuta daude. Hauen aukeraketa lagina zertarako erabiliko duzun arabera egiten da.



## 2.8 Irudi-kontrastea

Metal astunen bidez ematen da kontrastea. Berun zitratoa edo uranilo azetatoak zelulen egiturekin interakzionatzen dute. Laginen inpregnazioa egiten da, metal hauek laginaren gainean zabaltzen dira; laginaren dentsitatea handiagoa den guneeetan gehiago metatu. Proteinekiko afinitatea dute, horregatik, proteinen dentsitatea handia den gunek oso ilun ikusten dira, mintz plasmatikoa adibidez. Aldiz, dentsitate baxuagoko proteinak argiago.



Ondoren, mikroskopia elektronikoa erabiltzean, elektroiek laginan talka egin eta beheko pantailan isladatuko dira. Metal astunik ez dagoen zati batetik pasatzen badira, zeharkatu eta gune argiagoak ikusi. Saretxoa ez dute zeharkatzen eta beraz, zati horiek ez dira ikusiko.

## 3. Berezitasunak

### 3.1 Fixatu gabeko materiala

Batzuetan, ordea, proteina jakin baten jardura interesatzen zaio ikerlariari. Kasu horretan, lagina ezin da modu normalean fixatu (horren arrazoietakoa bat, adb. parafina likido eran badago, lagina T altuak jasaten ari dela esan nahi du, beraz, proteinak desnaturalizatuko dira). Kasu hauetan, krio-fixapena, krio-inklusioa eta krio-mozketa egiten dira.

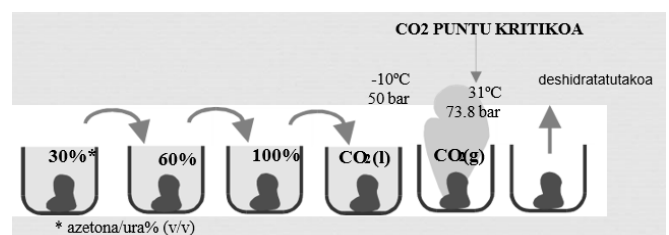


Lagina nitrogeno likidoan sartzen da eta jarraian izozten da, kristalak sortuko dira eta mintz egitura batzuk hautsiko dira. Horrela, bloke gogorrak lortzen dira, eta hauetatik kriostatoko/kriotomoa erabiliz, ebakitzen dira. Makina hauek, kongeladore baten barruan dauden mikrotomoen antzekoak dira.

Lagina portan itsatsi eta fixatu ondoren kongelagailuan gordetzen da. Ondoren, tindaketa bereziak erabiltzen dira. Metodo hau, hotz katea mantendu badaiteke soilik erabili.

### 3.2 Ekorkuntzezko mikroskopia elektronikoa

Mikroskopia mota hau, laginaren ebakiaren gainazala aztertzea interesatzen denean erabiltzen da. Laginari fixapen kimikoa egiten zaio. Baina deshidratatzerako garaian, uraren ordeaz alkohol/azetona sartu ondoren,



lagina P altuen pean eta T jakin batean (T baxuetan) jarri eta azetil/alkohola CO<sub>2</sub> likidoarengatik ordezkatzeko da. Gero, giro tenperaturan eta presio normalean CO<sub>2</sub> lurrundu eta lagina urrez/karbonoz estaltzen da. Horrela lagina prest dago ekorkuntzeko mikroskopio elektronikoan sartu eta gainazala ikusteko, 3D-ko irudiak lortuz. Prozesu honetan ez da lagina ebakitzen.

#### 4. Irudi-kontrastea

Normalean tindaketa orokorra erabiltzen da. Ohikoena H/E tindaketa da, pHaren arabera, atal bakoitza tindatu. Hematoxilinak azidoak urdin/more tindatu eta eosinak basikoak arrosa, matrizea adibidez.

Tindaketa espezifikoak ere badaude, hauei histokimikoak deritze: antolakuntza molekularra ezagutzeko. Tindaketa hauen bidez, izate kimikoak identifikatu, lokalizatu eta kuantifikatu daitezke. Jarduera entzimikoak identifikatu, adibidez.

##### 4.1 Histokimika

Zelulen osagai kimikoak identifikatu, lokalizatu eta kuantifikatzea; osagai estatikoak (karbohidratoak, lipidoak, proteinak, azido nukleikoak...), edo jarduera entzimikoak eta prozesu metabolikoak (xurgapena, endozitosia, garraioa, sintesia...) aztertu nahi direnean, tindaketa histokimikoak erabiltzen dira; hots, zelula eta ehunen in situ karakterizazio kimikoa helburutzat duen azterketa mikroskopikoa.

Histokimika, beraz, substantzia kimiko edota jarduera metabolikoen aurkikuntzaz arduratzen den zientzia da. Bi mota bereizten dira:

- Zitokimika (transmisio-mikroskopio elektronikoan)
- Histokimika (mikroskopio fotonikoan).

**Espezifikotasuna:** zenbait tindatzailek zuzenean interakzionatzen dute osagai batzuekin (lipidoekin, karbohidratoekin...). Baina, beti-beti erabili behar da **tindaketa kontrola**.

*Adib: Porta bat alcian urdinean sartu eta polisakaridoak tindatu. Bestea, kontrola izango dena, amilasan sartu. Entzima honek polisakaridoak kenduko ditu eta ez da tindatu beharko. Bigarren porta alcian urdinean sartzean tindatuta agertzen bada, errorea egongo da. Lipidoen kasuan, lagina izoztu eta kriostatoan ebaki. Ondoren lagin hori alkoholean sartzen bada, lipido guztiak disolbatu.*

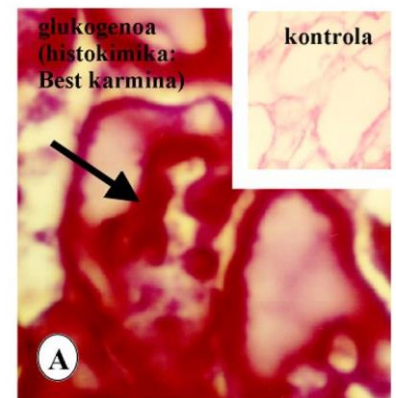
Fixapena eta gertakuntza: laginaren izaeraren arabera. Proteinetan fixapen kimikoa, lipidoetan hotzean. Entzimen jarduera aztertzeko, fixatzailerik ez. Hotzean badago jarduerarik ez, baina giro tenperatura jarduerarekin hasi.

Bi erreakzio mota:

- Erreakzio zuzena:  
 $\text{Substantzia (S)} + \text{R} \rightarrow \text{Ekoizkina (PF)}$  ikusgarria

Adibidez:

$\text{Taldeak-SH} + \text{ferrizianuro potasikoa} \rightarrow \text{ferrizianuro potasikoa urdina}$



Mukopolisakaridoak aztertzeko: Alcian urdinak zelula mukijariatzaileak tindatuko ditu. Tindaketa zuzena, polisakaridoak ikusi.

- Erreakzio ez-zuzena:

Tindatu beharreko substantziak tratatu eta eraldatu egiten dira, eta hauek bigarren erreaktibo batekin lotzean, kolorea ematen dute. Gardeinatuak

$S + R \rightarrow$  Hasierako ekoizkina (PI) ikusgaitza

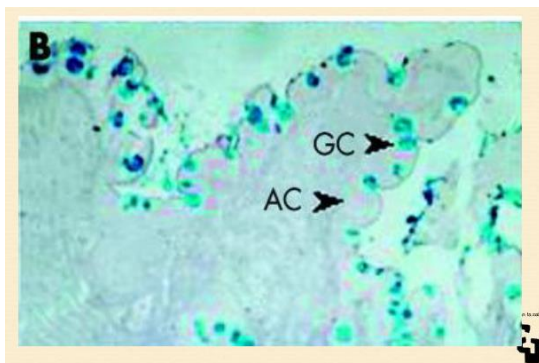
$PI + R2 \rightarrow$  Amaierako ekoizkina (PF) ikuskorra

Adibidez: PAS

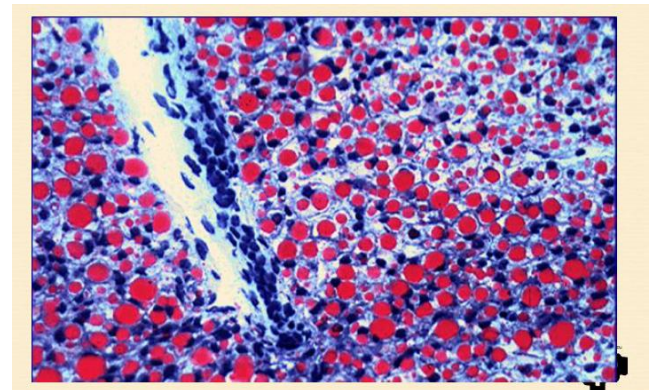
Glukogenoa (S) + Azido periodikoa (R)  $\rightarrow$  Aldehidoak (PI) ikusgaitza

PI + Schiff (R2)  $\rightarrow$  Ekoizkina (PF) ikuskorra

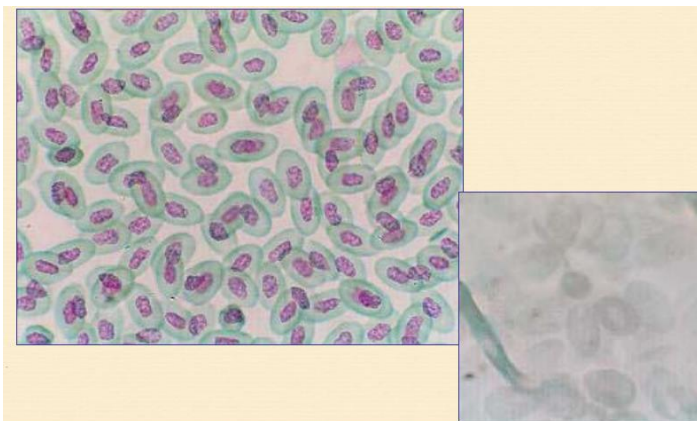
Schiff-ek karbohidratoen taldeekin erreakzionatzen, baina bai aldehido taldeekin. Lagina azidotan sartzen da, eta karbohidratoen taldeak aldehido bihurtzen dira. Orduan, lagina tindatzailearekin kontaktuan jartzen da eta erreakzioa gertatzen da, emaitza bezala kolore bat agertzen delarik. Baina hau egin aurretik, gure lagina aldehidoetatik garbitu behar da, bestela interesatzen ez zaizkigun aldehido taldeak tindatuko zaizkigu.



Alcian urdina polisakaridoen detektapenerako



Oil Red O tindaketa lipidoen detektapenerako



Feulgen tindaketa DNAREN detektapenerako + kontrola: DNAsa bidez egiten da kontrola. Zenbat eta DNA gehiago, tindaketa intentsoagoa. Horrela, DNA kunatifikatu. Minbizi zelule, adibidez, DNA asko dute, identifikatu daitezke.

#### Metalak detektatzeko teknika desberdinak

Au	Photochemical method (Danscher, 1981)	Stannous chloride reaction (Lillie, 1965)
	Elftmann method (Gabe, 1968)	
Pb	Chromate method, Fairhall (1940)	Rhodizonate method (Lillie, 1965)
	Lead sulphide method (Lillie, 1965)	
Mg	Titan yellow (Lillie, 1965 and Pearse, 1980)	
Ag	Timm method Lillie (1965)	Amplificate method (Danscher, 1981)
Zn	Okamoto test (Gabe (1968)	Dithizone method, Mager et al. (1953)
	Zincon perfusion, Hasan (1977)	
R	Gersh method (Pearse, 1980)	Tetraphenylboron method (Collawijn 1963)
Hg	Timm method (Lillie, 1965)	Brandino's method (Gabe, 1968)
Ca	Purpurin of Grandis and Mainini (Lillie, 1965)	Sulphide silver method Danscher (1981a)
	Silver method (von Kossa)*	Cobalt method (Stoeltzner)*
	Alizarin red S (Dahl, 1952)	Calcium red method, McGee-Russel (1955)
	Pyroantimonate method, Gravis (1979)	
Fe	Quincke method (Gabe, 1968)	Turnbull blue*
	Ferric iron (Prusia blue)*	Chlorate haematoxylin (Morton, 1978)
Al	Aurine methods, Irwin (1955)	Acid solochrome cyanine (Pearse, 1980)
Ni	Dimethylglyoxime method, Feigl (1954)	Choman method (Lillie, 1965)
Cu	Rubeanic acid, Okamoto & Otamura (1938)	Diethyldiocarbamate (Waterhouse 1945)
	Benzidine method (Pearse, 1980)	Mallory's hematoxylin (Lillie, 1965)
	Cyanine-tetrazolium, Gould & Karolus (1974)	



## 4.2 Konbinazioa

Histokimika mota desberdinen arteko nahastea. Kamaleoiaren hezurra gorritz tindatu eta kartilagoa urdinez.



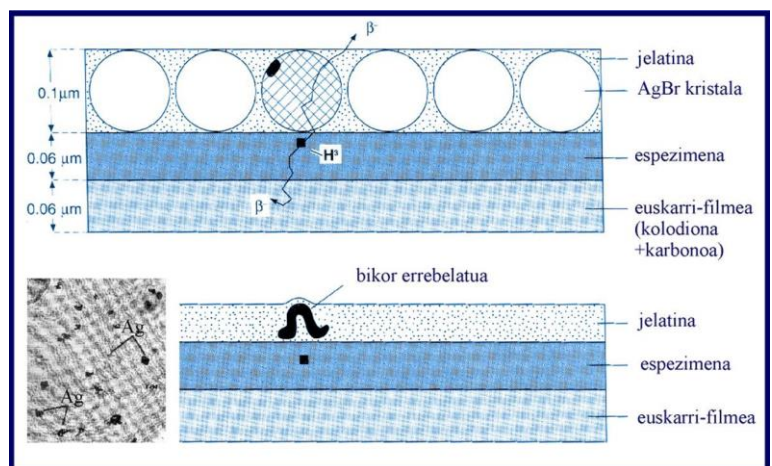
## 4.3 Autoradiografia

Histokimika mota berezia. Laginak kokatu eta nola mugitzen diren ikusteko, ikerketa metabolikoak. Ebakinetako isotopo erradioaktiboen presentzia aztertzen da **emultsio fotografikoaren** bidez.

Molekulak isotopo erradioaktiboekin markatzen dira, eta autoradiografia bidez, isotopo erradioaktiboak non dauden kokaturik aztertzen da. Ioi erradioaktiboek esker, zenbait jarduera metaboliko eta hauek igarotzen duten denbora azter daitezke. (Gaur egun, geroz eta gutxiago erabiltzen da teknika hau, **antigorputzak** erabiliagoak dira).

- Substantzia arrotzak: Po, Sr, As.
- Substantzia fisiologikoak:  $^{14}\text{C}$ ,  $^{24}\text{Na}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$  eta ioi metalikoak ( $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{22}\text{Na}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{42}\text{K}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ )

Adibidez: saguaren gibelean injektatzen dira ioiak (adibidez, C erradiaktiboak). Gibel horretan, zenbait proteinei dagozkien C erradiaktibo batzuk edukiko ditugu. Ioi erradiaktibo horiek erradioaktibitatea igortzen dute. Lagina erradioaktibitatearekiko sentikorra den emultsio fotografiko batekin (glizerinazko gelaz osatua, AgBr kristaldun jelatina) estaltzen da. (**Emultsio fotografikoa**: argiaren eraginez erreakzionatzen duen nahastea, argazki-plaka, pelikula edota paper gainean jartzen dena). Gel horretan dagoen zilarra prezipitatu, erreduzitu egiten da erradioaktibitatea dagoen guneeetan, eta beraz, emultsio horretan dauden gune dentsuak ikusita nire saguaren gibleko erradioaktibitate markak non dauden jakin dezaket.



Zelula kultiboetan ere egin daiteke hau. Pulse (aminoazido erradioaktiboak) and chase (ez-erradioaktiboak) sartzen dira zelula horietan eta nondik nora mugitzen diren aztertu daiteke: proteinak sintetizatu EEan, gero golgi aparatura, hortik besikuletara... TEM: fixapena, emultsioa, esposizioa, errebelatzea. Edo  $^{14}\text{C}$  erabiliz deoxiglukosa aurkitu.

## 4.4 Entzimen histokimika

Metodo honen bitartez entzima jakin batek bere substratuarekiko duen **espezifiktasuna** aztertzen da, baina entzima ez da zuzenean ikustarazten, bere jardura katalitikoa ikustarazten da soilik. Horretarako, laginak zuzenean izoztu behar dira; eta ez fixatu. Horren arrazoietakoa bat, adibidez, zera da; lagina parafinan sartzean, entzimak desnaturalizatu (T altua) egiten direla. Beraz, izozketaren ondoren, kriotomiaren bidez, ebakiak lortzen dira. Behin ebakiak lortuta, lagina desioztekoko aukera egon behar da, honek bere jardura berreskuratu dezan eta aztertzeke aukera eduki dezagun.

Entzimen histokimika modu desberdinean burutzen da mikroskopio fotonikoan edo elektronikoan egiten denaren arabera:



- Mikroskopia fotonikoan (histoentzimologia) erreakzio-ekoizkin koloredun edo fluoreszenteak erabiltzen dira
- Mikroskopia elektronikoan (entzima-zitokimika) ekoizkinari atxikitako material opakoak, beruna adibidez, erabiltzen dira.

#### Erreakzioak:

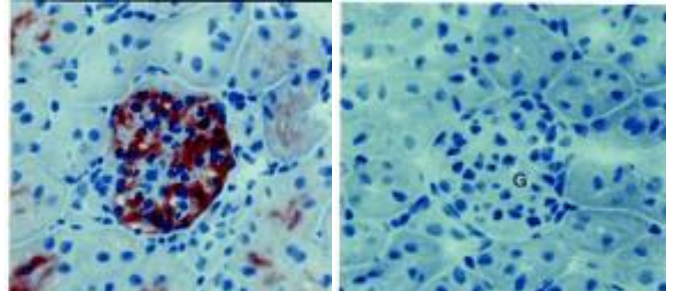
- Substratua + entzima = ekoizkina = produktua (tindatu, etiketa fluoreszentea...)
- Entzima + inhibitzailea = entzima /inhibitzailea-konplexua (fluoreszentzia, erradioaktiboki etiketatu...)

Erreakzio hauen bidez, entzima hori non aktibatzen den ikus daiteke, noiz bihurtzen duen substratua produktua.

Substratuaren presentzian entzima inkubatzen da, substratu egokiarekin inkubatu: PAUSU KRITIKOA da hau.

Lehenengo pausua jardura entzimatikoa preserbatzea da. Hasiera, fixapen kimikorik ez. Gero lagina izoztu (fixapen fisikoa) eta kriotomoan ebaki ondore, substratu egokiarekin inkubatu. Lan egiten hasi eta produktua sortu. Produktu nahikoa lortu ondoren, lagina fixatu (fotonikoan: formaldehidoa edo glutaraldehidoa erabiliz; eta elektronikoan: osmio tetroxidoa), eta ondoren tindatu egiten da.

Metodo honetan ere **kontrola** beharrezkoa da. Adibidez, ezkerreko argazkian aminopeptidasa A entzimaren jardura ikus dezakegu, eta eskuineko kontrolak (hemen entzima substratuarekin kontaktuan jarri baino lehen, inhibitzailearekin inkubatu da) baieztatzen digu, ezkerrekoan gorrixtatutako gunea, benetan aminopeptidasa A ren jardueraren ondorio dela.

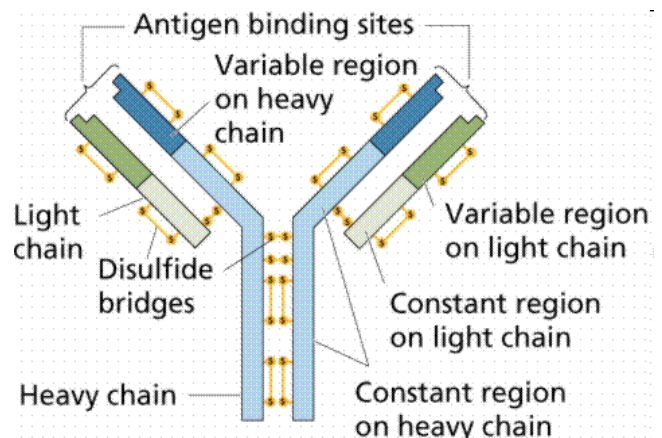


#### **4.5 Immunohistokimika/immunoizitokimika:**

Metodo hauek zelulen, ehunen eta organuluen konposaketa molekularra zein den jakiten laguntzen duten, edo, molekula ezberdinen banaketa tisularra edo zelularra ezagutzera ematen diguten teknikak dira.

Proteina horiek detektatzeko, antigorputz espezifikoak erabiltzen dira, antígeno bat (molekula bat) ezagutzen eta hona atxikitzen diren proteinak dira.

- Antigorputzak, edo immunoglobulinak: plasma-zeluletako sistema humoreko/immune glikoproteinak (B linfzitoetatik sortuak) dira. Hauek, antígeno izeneko beraien ligandoari lotzen zaizkie espezifikoki.
- Antigenoa: antigorputza lotzeko toki bat edo gehiago dituen proteina, karbohidrato edo lipido molekula da.
- Epitopoa (determinante antigenikoa): antigorputzak ezagutzen duen antígenoaren parte. Epitopo hauek, linealak edo konformazionalak izan daitezke.



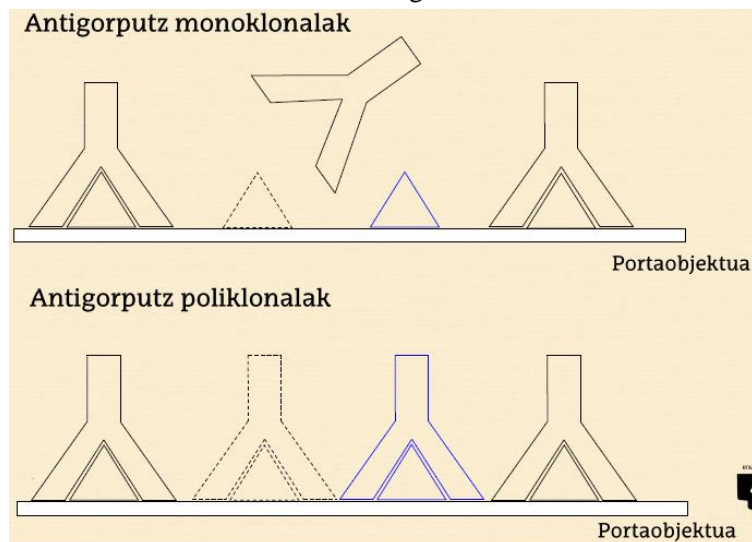
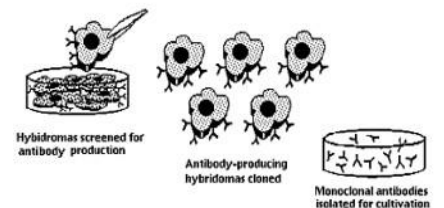
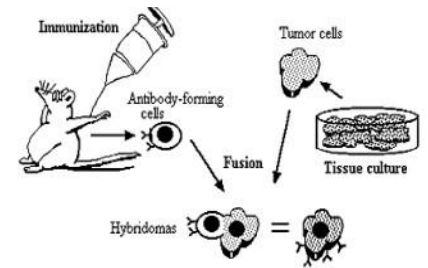
IgG-ak dira gehien erabiltzen direnak.

## Antigorputz poliklonalak/monoklonalak:

- Poliklonalak antigeno batetan epitopo bat baino gehiago ezagutzen dute, hau da, IgG molekula ezberdinen nahasketa bat da. Ez denez modu espezifikoan lotzen, lana akastu dezake. Hauek antigenoa (proteina purua) animali bati injektatuz lortzen dira. Animalia horrek proteina arrotz horren kontrako antigorputzak sortuko ditu. Normalean untxia erabiltzen da, baina ahuntza, txerria, zaldia, akuria eta oiloa ere erabili daitezke. Gero antigorputz horiek odoletik isolatuko dira.
- Monoklonalak epitopo bakarra ezagutzen dute. Erabilera murriztagokoak izango dira, garestiak baitira sortzeko, baina modu oso espezifikoan lotu.

Monoklonalak lortzeko:

- Antigenoa eskuratu eta animali bati injektatu
- Animalia B linfozitoak batzen dira eta horietako **bakar bat** isolatzen da
- B linfozito hori mielomako (minbizi) zelulekin fusionatzen da
- **Hibridoma** bat sortarazten da, hau da, oso azkar eta mugarik gabe zatitzen da eta antigorputz bakarra sortarazteko gai da (B linfozito bakar batetik eratorria).
- Orduan, epitopo BAKAR bat ezagutuko duen antigorputz berdin BAKAR baten kopia mordoa edukiko dugu.



Portaobjektuan proteina pila bat daude.

Poliklonalen kasuan, gerta daiteke gure interesekoa ez den antzeko proteina batekin lotzea eta seinalea ematea. Kasu horretan seinale faltsua izango zen.

Behin antigorputzak lortuta, gure portan lagin bat daukagunean, hauek antigorputzarekin kontaktuan jartzen dira. Orduan, antigeno-antigorputz erreakzioa ikustarazi behar da. Horretarako, bi metodo daude:

- Teknika zuzenetan: antigenoari lotzen zaion antigorputza zuzenean markatzen da, molekula fluoreszente batekin; adibidez Igari lotuta doan entzima, substratuarekin lotu eta produktu fluoreszentea sortzea. Horrela mikroskopioaren bitartez, bere atxikidura behatu ahal dezakegu.

Baina hauek ez dira oso fidagarriak, zeren lortzen den seinalea, oso ahula eta inespezifikoagoa da, teknika ez-zuzenekin alderatuz

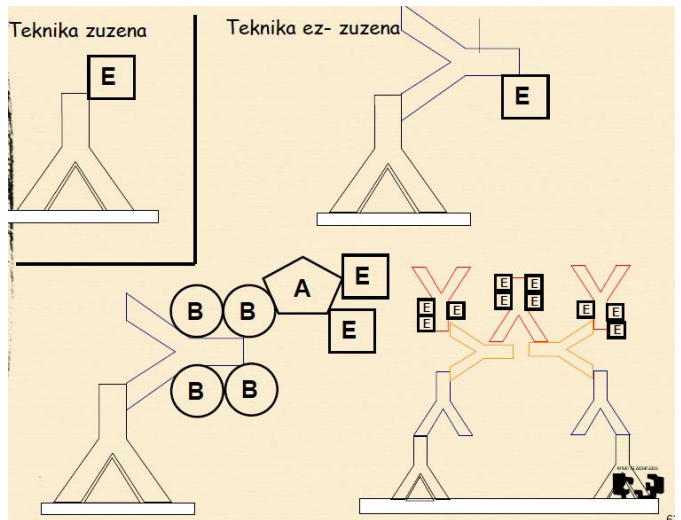
- Teknika ez-zuzenetan: antigenoari lotzen zaion antigorputzak ez du markatzailerik eta antigenoaren kokapena zehazteko bestelako pausu batzuk jarraitu beharko dira:

- Markatuta dagoen antigorputz sekundario bat gehitzen da, eta honek, antigorputz primarioa ezagutzen du. Hau da, antigorputz espezifikoa (1°) untxian sortutakoa bada, 2.

antigorputza, 1. horren aurkakoa den ahuntz antigorputz bat izan daiteke (antiIgG).

Normalean, antigorputz primarioari lau bat antigorputz sekundario lotzen zaizkio, fluoreszentzia edo entzimaren bat atxikita dutenak. Ondorioz, seinalea lau aldiz fuertagoa izaten da; **seinalea amplifikatzea** lortzen da. Gauzak gehiago handitu daitezke 3. antigorputz bat sartuz gero, baina inespezifikotasun arrisku txiki bat ere badago. Horregatik, guztiz beharrezkoak dira kontrolak erabiltzea.

- **Adibidez:** IgG-ren alde konstantea espezifikoki atxikitzen duten A proteinak edo G proteinak erabil daitezke. Proteina horiek, markatuta egongo lirateke. Gehitzen den bigarren antigorputza biotinarekin markatuta egon daiteke. Jarraian, markaturiko abidina erabil daiteke, eta honek biotina lotuko du espezifikoki eta kolorea eman.



Erabiltzen diren markatzaileak desberdinak izango dira erabiltzen den mikroskopiaoren arabera.

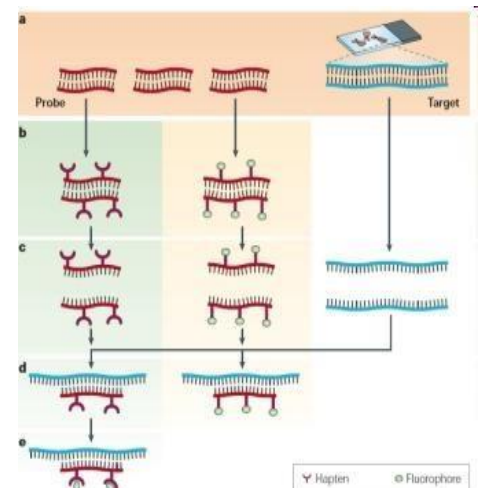
- Argi mikroskopioan: kolorea duten edo kolorea eman dezaketen markatzaileak erabiltzen dira (errefrau peroxidasa, fosfatas alkalinoa...).
- Fluoreszentziako mikroskopioan, markatzaile fluoreszenteak erabiliko dira (fluoreszeina, errodamina...).
- Mikroskopia elektronikoan, berriz, markatzaile elektrodentoak erabiliko dira (urre koloidala, ferritina...). Au oso dentsoa da eta ezin dute elektroiek zeharkatu. Mikroskopiaon guñe beltz bat bezala ikusi.

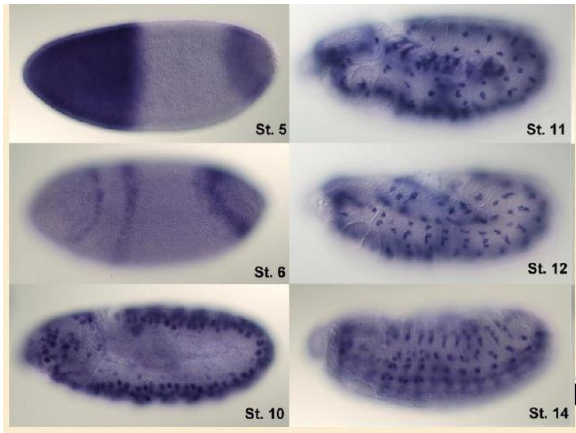
#### 4.6 In situ hibridazioa:

Teknika honen bidez, ez dira proteinak detektatzen, RNA edo DNAREN sekuentzia baizik, sekuentzia konkretu baten lokalizazioa egiten da. Horretarako, **ISH Zunda** erabiltzen da: lokalizatu behar den cDNA edo cRNAREN sekuentziarekiko osagarria den oligonukleotidoa. Normalean, harizpi bakarrekoak izaten dira, errazago sartzen baitira ebakinetan. Sekuentziaren markaketa, markatzaile erradioaktiboak, haptenoa, entzima bat, fluoreszentzia... erabiliz egiten da.

Dioxigenina da gehien erabiltzen den molekula markatzailea. Hau sekuentzia osagarriarekin lotzen da.

Kontrola: Porta batean sekuentzia osagarria jarriko da eta bestean sekuentzia bera. Azken honetan ez zen seinalerik egon beharko.





*Drosophila*: garapenean ez du zatiketa zelularrik egiten, nukleo ugari izango ditu. Hauek zelularen ertzetara doaz, beraien zitoplasma propioa sortu eta indibidualizatuz doaz.

## 2. Oinarriak eta instrumentazioa mikroskopian

### 1. Sarrera

Gizakion begiak muga batzuk ditu: soilik argi ikuskorra ikusteko gai da, eta bereizmena mugatua du. Mikroskopioei esker, ordea, egitura txikiagoak ikus ditzakegu. Mikroskopio fotonikoan ikus ditzakegun osagairik txikiak bakterioak, mitokondrioak... dira, eta hori, lagina oso ondo prestatuta dagoela suposatuz. Mikroskopio elektronikoan, berriz,  $1\text{\AA}$ -raino ikus dezakegu.



### 2. Bereizmena

Bereizmena objektu bi, bi bezala ikus ditzakegun banapen-distantziarik laburrena da.

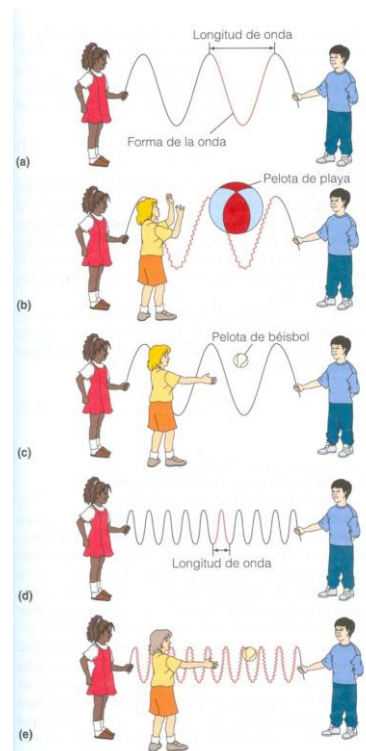
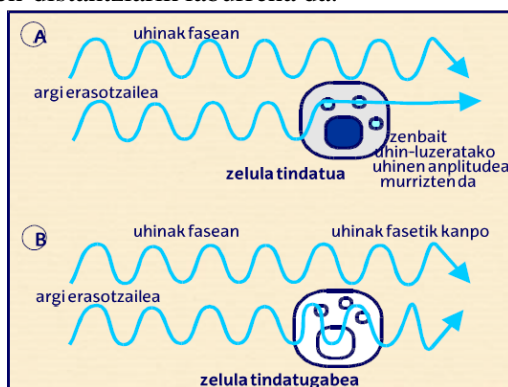
*Bi objektu hauen arteko distantzia zenbat eta txikiagoa izan, bereizmena zailagoa da. Distantzia zenbat eta handiagoa izan, bi objektu bezala ikusteko bereizmena handiagoa da. Mikroskopioek ez dute lagina handitzen, gerturatu baizik. Ez dute bi objektuaren arteko distantzia handitzen, behatzarekin eta objektuaren artekoa baizik. Horrek bereizmena handitzea dakar.*

Hainbat faktorek mugatzen dute:

- Objektuaren eta argi-uhinaren elkarrekintza: elkarrekintza hauen ondorioz, difrakzioaren ondorioz, objektua ikuskor bihurtzen da. Argia foton bezala mugitzen da eta honekin interakzionatzen duena soilik ikusi.
- Objektutik objektibora doan argi difraktatuaren anplitudea (uhin luzera): argi uhinak, soilik, uhin-luzerarekiko handiak diren objektuak difraktatu ditu; objektu txikiak ez. Izan ere, interakzioak sortzen ez bada, ez dago informaziorik. Beraz, uhin luzera txikia bada, horrekin interakzioa dezaketene objektuak ere txikiagoak izan daitezke. Beraz, bereizmena handiagoa izango da. Zenbat eta txikiagoa izan objektua, gero eta zailagoa uhinak honekin interakzionatzea.

Beraz, argia bereizmenaren mugatzailea da.

- Lenteak: lenteetan zenbat eta argiaren foton gehiago eskuratu, gertaturiko interakzioei buruzko informazio gehiago egongo da. Beraz, objektuaren (laginaren) eta objektiboaren arteko distantzia zenbat eta handiagoa izan, sortuko den angelua txikiagoa izango denez, argi difraktatu asko galduko da (alboetarantz), bereizmena





urria izanik. Aldiz, objektiboa objektutik gertu badago, angelua handiagoa izango da, difrakzioa handia eta bereizmena hobea izango da.

Ondorioz, lentea eta objektiboa ahalik eta hurbilen.

- ABBE-ren ekuazioa: inguruneak eragina du gure laginean.

$$r \text{ (erresoluzioa)} = \frac{0,61 \lambda \text{ (uhin luzera)}}{n \text{ (errefrakzio indizea)} \sin \alpha \text{ (irekidura angelua)}}$$

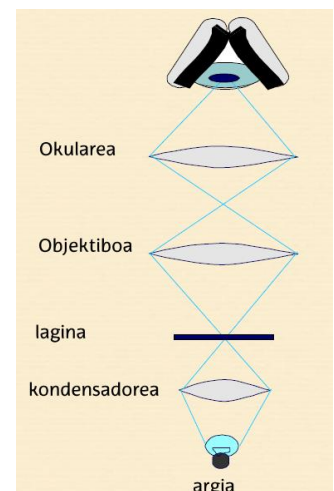
Adibidez, inmertsio olioak 196nm-ko erresoluzioa du.

### 3. Mikroskopia fotonikoa eta erlazionatutako barianteak

Mikroskopia batean hiru atal: argiztapen-sistema, laginaren euskarria eta irudi-sistema. Hauen hiruren konbinazioari esker ikusten dugu lagina.

Mikroskopian lagina ikusteko, hau argiarekin estali behar da homogeneoki, eta honen intentsitatea kontrolatu behar da. Kondentsadoreak, argia laginera enfokatzen du ahal den homogeneotasun handienarekin. Askotan argia ez da osorik heltzen eta kondentsadoreak ez du puntu zehatzean jotzen. Kondentsadorea irekiz, argiaren kantitatea murrizten da,  $\alpha$  angelu handiko izpiak ezabatzen baititu. Aldiz, kondentsadorea itxiz, kontraste altua eta distira baxua lortzen dira.

Batzuetan, argiztapen bereziak erabiltzen dira. Hauen argi luzera txikiagoa da, eta beraz, objektu txikiagoekin interakziona dezakete (bereizmen gehiago). Distira handirako (intentsitatea handiarekin jaurti fotoiak): **karbonozko arkua** (ez-egonkorra), **merkuriozko lanpara** ( $\lambda=0,546\text{nm}$  berdea, oso arriskutsua da, eztanda egin dezake), **xenonezko lanpara** (monokromatikoa)...



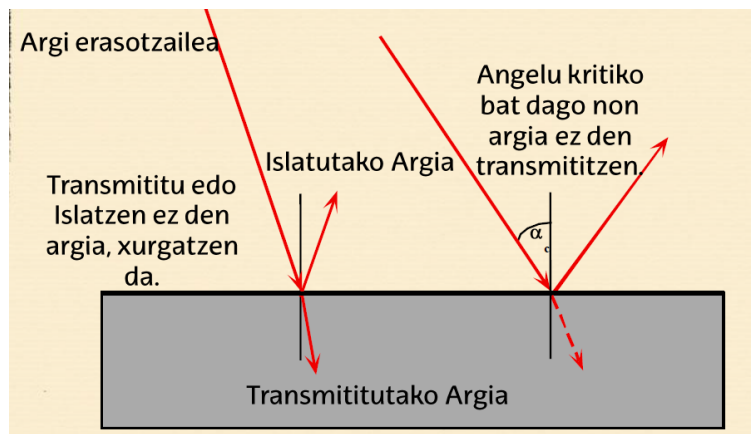
#### 3.1 Lagina/Argia elkarrekintzak

Laginera jaurtitzen den argi erasotzaileak bide desberdinak har ditzake: lagina zeharka dezake (transmititutako/errefraktatutako argia), errebotatu dezake (islatutako argia, hau da mikroskopioan ikusiko dena), edo xurgatu egin daiteke (transmititu edo islatzen ez den argia, xurgatu egiten da). Argi erasotzailea zenbat eta zuzenago joan, orduan eta gehiago transmititu. Aldiz, oso inklinatuta badoa, ez da izpirik transmititzen. Angelu kritiko deitzen zaio puntu horri.

Fotoiek ezin badute zeharkatu → puntu beltzak

Erraz zeharkatzen badute → zuri

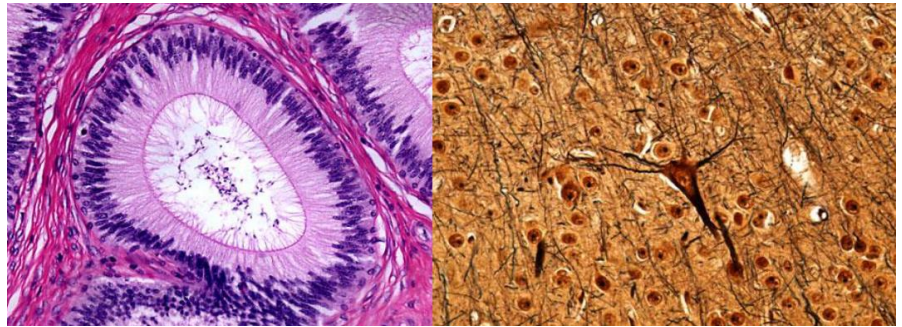
Lagina zenbat eta finagoa izan, gero eta argi gutxiago xurgatzen du eta bereizmen hobea lortuko da.



### 3.2 Iluminazio sistema bereziak

#### - Eremu Argia:

Ebakin arruntak aztertzeko erabiltzen da; tindaturiko edo pigmentudun laginak behatzeko. Lagina oso potoloa bada, argiak ez du zeharkatzen. Beraz, hobe da lagina finagoa izatea.



Neurona bat, zerebrokoa.

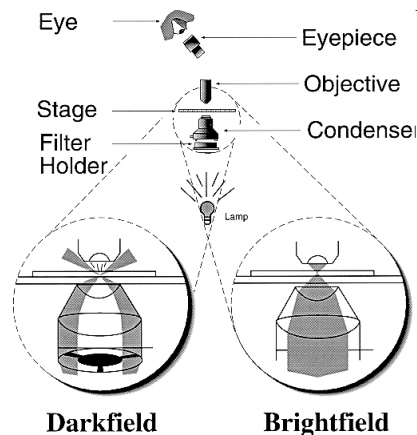
#### - Eremu Iluna:

Argiak ez du lagina zeharkatzen, blokeatu egiten da argia eta soilik ertzetako izpiek jotzen dute lagina. Modu transversalean jo laginetan, ez da zuzena, oso angelu handiarekin.

Objektuetatik igorritako argia soilik ailegatzen da begietara. Metodo egokia da laginak berez argia igortzen badu edo oso pigmentaturik dauden egiturak ikusteko. Baita oso gutxi tindaturiko laginak ikusteko ere.

Metodo hnen bidez, laginen atzealdea beltz ikusten da eta pigmentuak agertzen dira. Honen erabilera: hazkuntzetan edo egitura bizieta, esekidura zelularrak (legamiak, bakterioak, protistoak), ura...

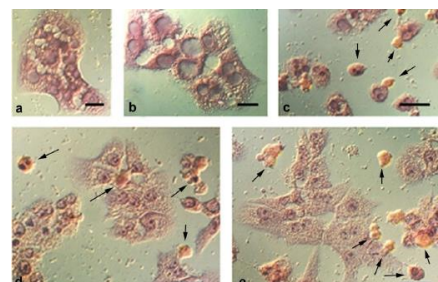
Izpiak difraktatuak edo islatuak etenka optikoen bitartez (mintza, nukleoa, organuluak)



#### - Fase Kontrastea:

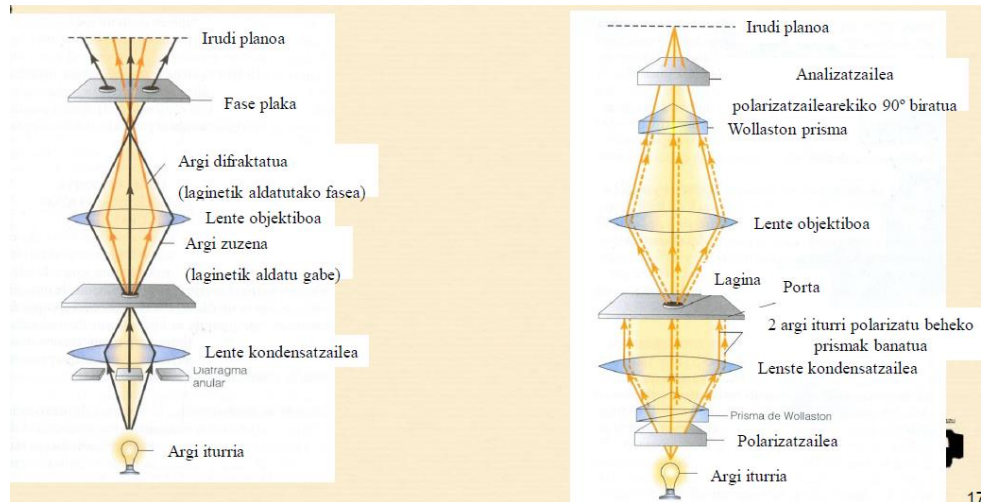
Argi polarizatuak lagina zeharkatzean, fotoiek uhin luzera berdina eduki beharko lukete, baina lagina homogeneoa ez denez, (osagai bakoitzaren errefrakzio indizearen arabera), gune dentsoek interakzio gehiago izaten dituzte argiarekin, eta ondorioz, uhinak atzerapen bat jasaten du. Fase desoreka bat egoten da, zeren egitura ez dentsotik pasatuko argiak ez du atzerapenik jasaten. Horrela, dentsitate desberdineko egiturak identifika daitezke. Amaieran filtro bat dago, fase desoreka hori ikusten duena.

Hau hazkuntza zelularretan erabiltzen da, tindatu gabeko egiturak ikusi. Argi intentsitatea ez da altua eta lagina ez da berotzen. Bereizmena ez da oso handia. Adibidez, Nomarsky, zelula bizien mugikortasuna ikusteko → Fotoien fase desplazamenduen arabera, egitura desberdinak





DIC: fase kontrastearen bariantean oinarritu irudiak sortzeko



### 3.3 Mikroskopia mota desberdinak

- Alderantzizko mikroskopia:

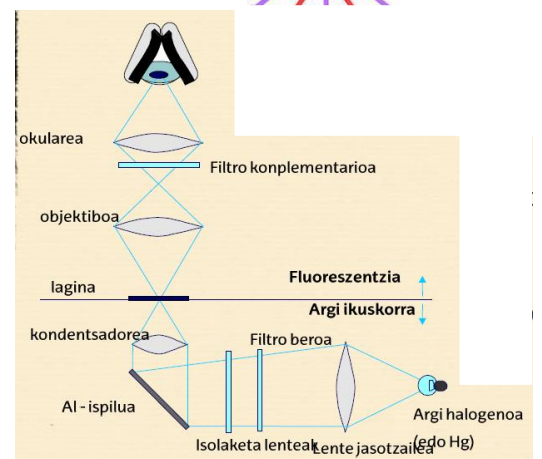
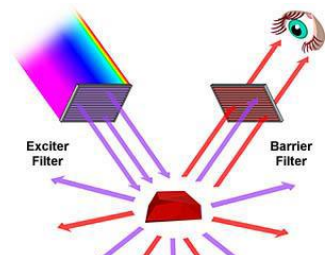
Mikroskopia honekin eremu sakonerari buruzko informazio hobe lortzen da, baina bereizmena jaitsi egiten da, objektiboa eta labinaren arteko distantzia handiagatik. Hazkuntzetan erabiltzen da. Argia goitik dator, lagina jo, objektibora bidali eta ispiluaren bidez okularera. Argia labinetik urrundu eta hurbildu arren, lagina ez da berotzen. Kondentsadorearen bidez, zelula osotasunean enfokatuta ikusi.



- Fluoreszentziazko mikroskopia:

Molekula fluoreszenteek/kitzikagarriek uhin-luzera bateko argia xurgatu eta beste uhin-luzera bat igortzen dute.

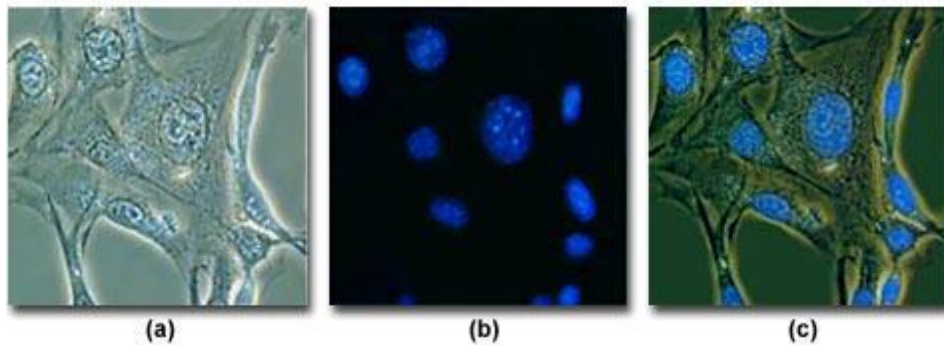
- Argi iturria: berezia da, lanpara halogenatuak erabiltzen dira normalean, baina argi ultramoreak zein merkuriozko lanparak ere erabili daitezke. Konposatu fluoreszenteen uhin luzera argiarena baino txikiagoa da, eta ondorioz, egitura txikiagoak ikus ditzakegu. Argi halogeno (uhin-luzera txikia, bereizmen hobe) hau **lehen filtro** berezi batetik igaroarazten da. Filtro honek, uhin luzera konkretu bat soilik uzten du pasatzen labinera; markatzaile fluoreszentea kitzikatzen duen fotoia hain zuzen ere. Ondoren, **bigarren filtro** berezi batek, markatzaile fluoreszenteak igortzen duen uhin luzera berria soilik uzten du pasatzen. Adibidez, DNA partikula fluoreszentez tindatzen dugu. Guk fluoreszente horren uhin luzera zein den jakinik, filtroak jarriko genituzke.
- **Epi-fluoreszentzia**, berriz, argi erasotzailea fluoreszentea da. Argi erasotzaile hau objektiboan zehar zuzenean labinaren gainetik pasatzen da, eta objektibo berdina erabiliz, labinak igorritako argia ikus daiteke.





Objektibo horretan, filtro desberdinak daude, argi kitzikatzailea pasatzen uzteko eta igorritako molekulak pasatzeko.

#### Combined Use of Phase Contrast and Fluorescence Illumination



Fluoreszentzia bidez kontrastea asko handitu.

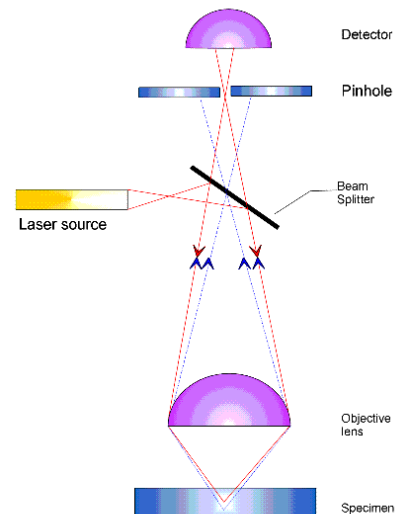
- 3T3 fibroblastoen kultiboen monokaparen irudia fase kontrastedun mikroskopioan
- Fluorescence illumination DAPI (modu espezifikoan azido nukleikoak tindatzen dituen gatza, igorpena 461nm) markatzaile fluoreszenteaz argizatutako lagina
- A eta B-ren konbinaketa

- Mikroskopia konfokala:

Egitura handiak ikusteko aproposa da; ebaki gabeko lagin biologikoen ebaketa birtualen oso eremu sakonera txikiko ikuspegi bereziak ematen ditu (lagin lodi baten “azpiko” zatiak ikus ditzakegu). Hiru dimentsiotako irudien sentsazioa ematen du. Gune txikiak argizatzen eta ikusten dira.

Metodo honetan, laser bat proiektatzen da laginaren gune espezifiko batean, kitzikatu eta bertatik fluoreszentzia bat ateratzen da. Ondoren, fotoi gutxik zeharkatu puntu-zulo konfokala. Hori bakarrik fokatu. Horko informazioa soilik jasoko da. Laserra ispiluen laguntzarekin, lagin osoan zehar mugitzen da. Fluoreszentzia bakoitza banan-banan jasotzen da eta ordenagailu batean lagin osoaren informazioa biltzen da.

Argi eta fluoreszentzia mikroskopioekin alderatuz zenbait abantaila: irudi definituagoak lortzen dira, eremu-sakonera kontrolatu bat lor daiteke, eta fokatu gabeko eremuak ezabatu egiten dira. Gakoa iragazpen espazialaren erabilpenean datza, horrela fokatze-planoa baino lodiagoak diren laginetan, fokutik at dagoen argia ezabatzen da.

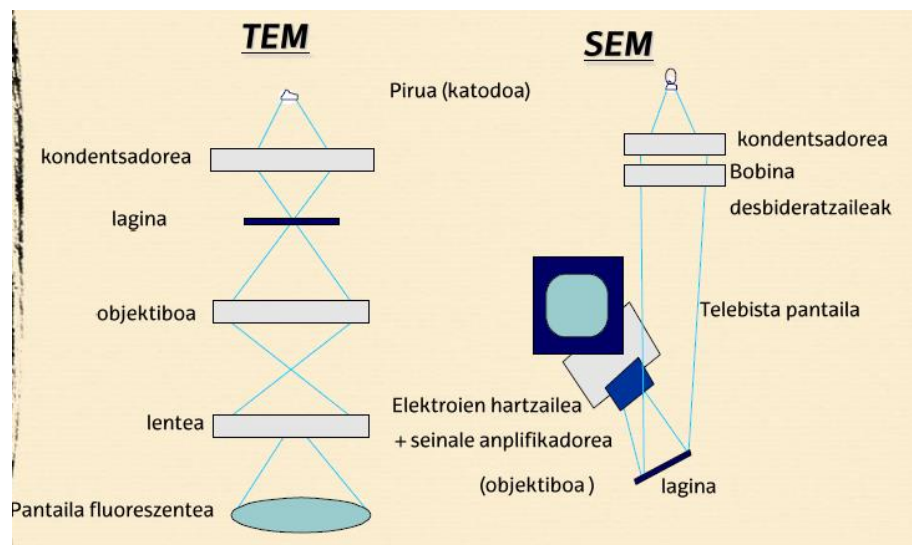


Note: arrow heads denote light path direction  
 Out of focus light  
 In focus light

#### 4. Mikroskopia elektronikoa:

Argi iturri gisa, elektroiak erabiltzen dira fotoien ordez. Hauen uhin luzera askoz ere txikiagoa denez, bereizmena handiagoa da. Uhin luzera 0,03nm-koa da eta beraz 200000 aldiz handipen handiago lortu beharko zen mikroskopioa hauekin. Mikroskopia elektronikoa mota desberdinak daude, adibidez, transmisio mikroskopia elektronikoa (TEM) eta ekorkuntzezko mikroskopia elektronikoa (SEM).

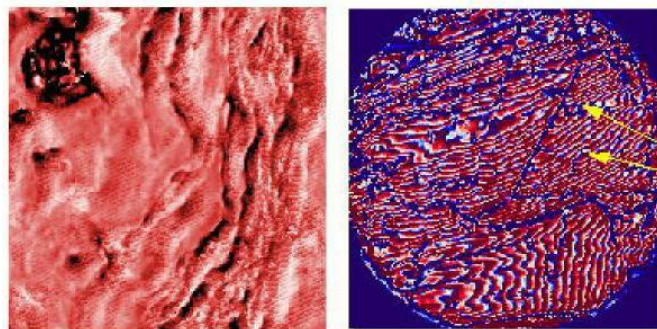
- Transmisio mikroskopio elektronikoa: elektroiek kondentsadorea zeharkatzen dute eta ebaki fineko laginaren gainetik igarotzen dira. Lagina zeharkatzen duten elektroiak fosforozko pantaila baten aurka txokatzen dira. Xafla honek oxidazioa eta beste zenbait aldaketa jasaten ditu, eta hortik, irudi bat eskura dezakegu. Horretarako, mikroskopio barruan ezin du aieririk egon (airea balego, elektroiek airearen partikulekin talka egingo lukete eta ez lirateke laginera iritsiko). **Transmititutako elektroiak** jasotzen dira.
- Ekorkuntzezko mikroskopio elektronikoa: mikroskopio honen bidez, laginaren gainazalari buruzko informazioa lortzen da. Elektroiak **piru edo alambre** berezi batek askatzen ditu berotzen denean. Hauek, kondentsadorea zeharkatu eta telebista pantaila batetik igaro ondoren, metal astunekin estali den (adibidez, urrearekin) lagina zeharkatzen dute. Hartzaile (detektore) bat, laginean zehar mugitzen da eta elektroi horiek transmititutako informazioa harrapatzen dute. **Islatutako elektroiak** jasotzen dira, elektroi sekundarioak, laginak igortzen dituenak.



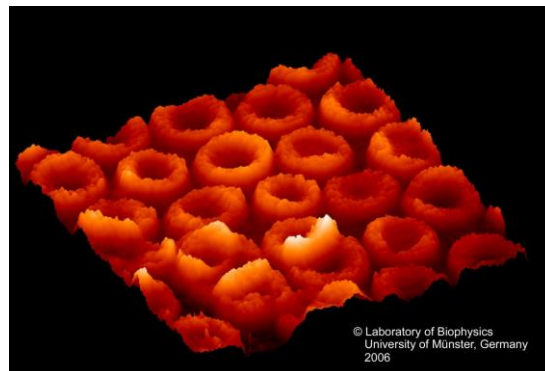
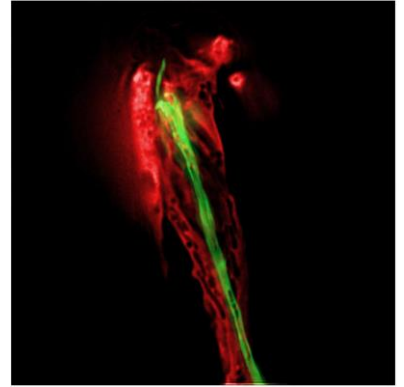
## 5. Beste mikroskopioak

Aipaturiko mikroskopio horietaz gain, badaude beste zenbait ere:

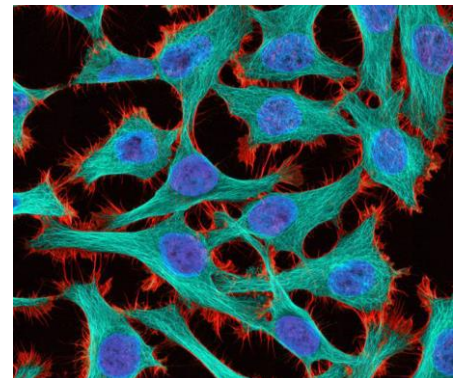
- Ekorkuntzezko mikroskopio konfokala
- Mikroskopio akustikoa: kalitate txarra, informazio gutxi. Uhin luzera oso baxuko uhin akustikoetan oinarritu. Lagina jo eta talka egin. Lagina ez da hil edo ebaki behar, in vivo. Teknika oso zaharra.



- Dekonboluzio digitalezko mikroskopia: konfokalaren antzekoa. Enfoke azalera osoari buruzko informazioa aldi berean lortu, laser bidez. Laginaren enfokea aldatuz, sakonera aldatu. Ez du bereizmen ona, baina fluoreszentzia baino hobea.
- Stem
- Mikroskopia krioelektronikoa
- Indar atomikozko mikroskopia: odol tanta. 1nm-ko distantziara pasatu detektorea eta informazioa eskaneatu. Kolpatzen ere pasatu daiteke. Azalerari buruzko informazioa eskuratu. Laginaren eta hartzailearen arteko indar atomikoetan oinarrituta. Informazio hori ordenagailu batetara. Sentikortasun oso handia.



- Bi fotoien mikroskopia: uhin luzera jakin bateko bi fotoi bakarrik zeharkatu lagina. Hazkuntza zelularretan. Laginak emititzen duen fluoreszentzia argiago eskuratu. Bakarrik zati batzuk kitzikatu. Bereizmen handiagoa. Egitura lodiagoak aztertu daitezke.
- Superresoluzioa: optikoak, STORM mikroskopia.



### 3. Ernalkuntza

#### 1. Sarrera

##### Kontzeptuak:

- Sexualitatea: gurasoetatik datozen geneen konbinaketa da, eta ebolutiboki oso abantailatsua da, dibertsitatea egotea ahalbidetzen baitu.
- Ugalketa, indibiduo berri baten sorrera dakarren prozesua da. Ugalketa **asexuala** edo **sexuala** izan daiteke:

- Ugalketa asexuala: indibiduo berriak gurasoekiko guztiz berdinak dira.

Organismo unizelularrak: bakterioak

Landareak: ugalketa begetatiboa

Animaliak: anemonak, zenbait zizare

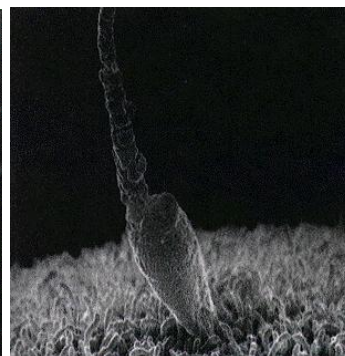
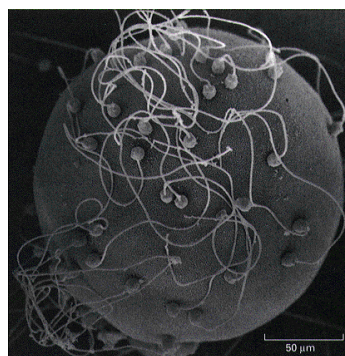
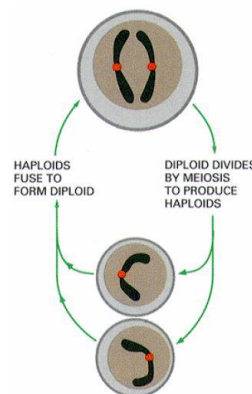
- Ugalketa sexuala: indibiduo berriak gurasoekiko desberdinak dira.

Zenbait prokariotoetan

Landare eta animalia gehienetan ematen da.

Bi zelula berezik hartzen dute parte: **obuluek** eta **espermatozoideek**. Hauen berezitasuna zera da, zelula haploideak direla; hots, DNA kopuru erdia dute meiosiari esker. Horrela, bi zelula hauek konbinatzean, zelula diploide normalak lortzen dira.

**Abantailak**: konbinazio genetiko ugari egotea ahalbidetzen duenez, ingurumen aldakor batean ondorengo batek gutxienez, bizirik jarraitzeko aukera handia du.

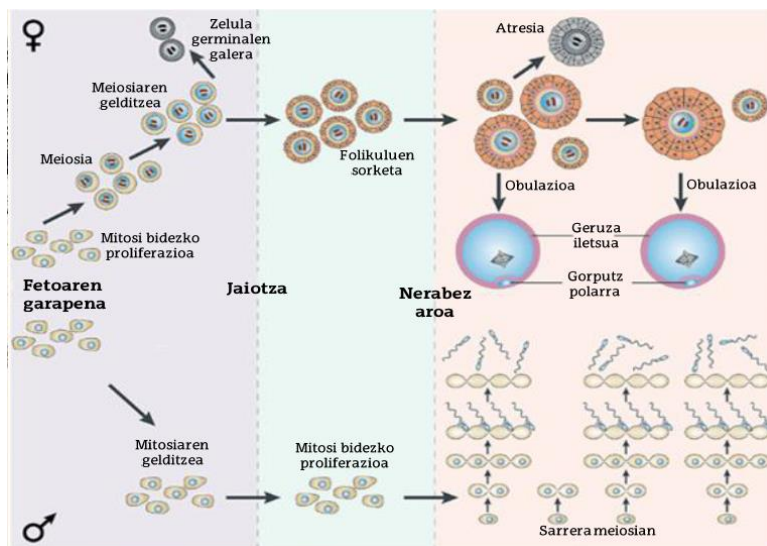


#### 2. Gametoen sintesia

Obulu bat ernaltzen denean, zigotoa sortzen da. Hemengo zelulak mitosiz zatitzen hasiko dira, zelula diploideak dira. Aldiz, gametoetan, ernaltzeko zeluletan, meiosis ematen da eta zelula haploideak sortzen dira. Denbora eta modua desberdinak dira ar eta emeeetan.

Zelulak, jaio aurretik, zatitzen eta proliferatzen doaz. Zigotoa handituz joango da. Zelula kopuru handia dagoenean, zelula diploide batzuk mitosiz zatitzeari utzi eta nerabezaroan meiosis zatitzen hasiko dira. Gero eta zelula germinal gehiago sortuko dira, hau espermatozoideen kasua.

Obozitoen kasuan, aldiz, zelula desberdintzatu gabeak, mitosi bidez zatitzen hasten dira eta horietako batzuk meiosis sartuko dira. Hala ere, prozesua I profasean geldituko da. Nerabezaroan, horietako





Hauek, obozitoa elikatzen dute (nutrienteak endozitosi bidez sartuz), eta horien geruzak gehituz doazen heinean, obozitoa ere gehiago elikatuko da, tamainaz handiagoz, eta horrela, **folikulu primarioa** sortuko da, zelula kubikoz osatua.

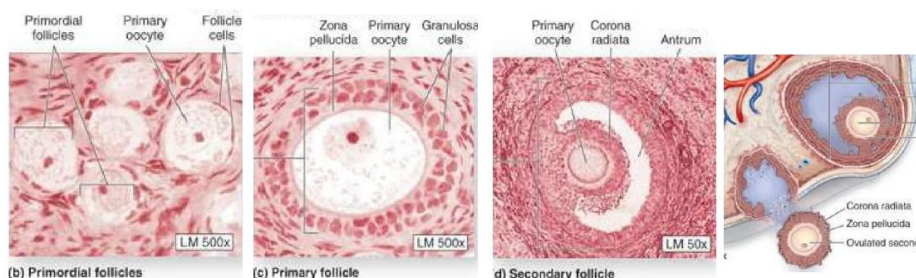
Geroago, zelula folikularrak zatitzen hasten dira, ugaritzen, geruza bat baino gehiago eratuz. Zelula folikularren artean barrunbe bat (atrioa) sortzen da, eta egitura horri, **folikulu atriala** edo **sekundarioa** deritzen.

Folikulu sekundariotik, folikulu heldurako bidean, obozitoak I. zatiketa meiotikoa bukatzen du eta bi zelula asimetrico sortzen dira: obozito “normala”/sekundarioa\* eta gorputz polarra. Gorputz polarrak, DNA eta zitoplasmaren zati txiki bat darama. Ondoren, zelula hau digeritua izaten da. Obozito “normala”, berriz, DNAz eta ia zitoplasma guztiaz osatzen da, eta inguruan dituen zelula folikularrak ere berarekin eramaten ditu.

Horrela, pixkanaka, zelula eta atrioa handituz doa, eta folikulu tertziarioa (heldua, Graff-en folikulua) sortzen da. Hau eratzean, obulua zelula folikulu horretatik askatu eta Falopioeren tronpetatik jaitziko da. II. zatiketa meiotikoa, soilik obulua espermatozoidearekin elkartzean amaituko da. Orduan, zigoto ernaldia eratuko da.

Hilean behin, zelula folikular bat apurtu egiten da eta askatu egiten da Falopioeren tronpetatik obarioetara. Hile bakoitzean alde batetik edo bestetik jaitziko da. Geratzen den obulu zatia degradatzen eta liseritzen doa, gorputz luteoa sortuz. Hau ez bada ondo kentzen, kiste bat eratu daiteke.

\*Obozito sekundarioaren egitura horri **koroa erradiatua** ere esaten zaio.



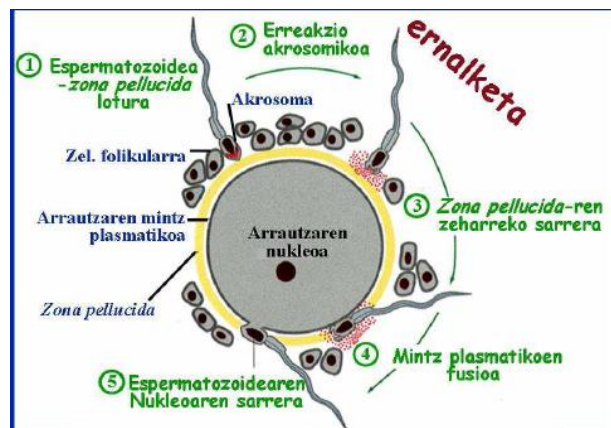
### 3. Ernalketa prozesua

- Espermatozoideen gaitzea
- Kumulo zelulak/folikularrak zeharkatu
- Erreakzio akrosomikoa geruza iletsuan
- Obozitoaren mintzarekin lotu eta fusionatu

#### 3.1 Espermatozoideen gaitzea

Espermatozoideak isurtzean, 180 inguru askatzen dira. Asko ez dira bideragarriak, akatsak dituzte. Hauek ez dira helduak, ezin dute obozitoa ernaltu.

Emakumeen baginan gertatzen da espermatozoideen gaitzea edo kapazitazioa. Hor espermatozoide akasduak (gehienak) eta onak daude. Emearen ugal traktuan akatsduak *cervical mucusen* bidez kentzen dira.



Umetokira heldutako espermatozoideak ez dira guztiz funtzionalak, baina bertan gertatzen diren aldaketei esker funtzional bihurtzen dira. Horretarako, zenbait aldaketa:

- Mugikortasuna aldatzea
- Obozitoekin fusioatzeko gaitasun garatzea
- Proteinen fosforilazio mailak aldatzen dira
- pH aldaketa bat ematen da eta mintzeko kolesterolean aldaketa gertatzen da. Horren ondorioz, espermatozoideen mintza  $Ca^{2+}$ -ekiko iragazkorragoa bihurtzen da
- Mintz potentzialaren hiperpolarizazioa

Obiduktuan dauden dentsitate altuko lipoproteinek kolesterolarek fluxua emendatzen dute eta honek gaitzearen hainbat aspektu bultzatzen ditu:

- Emearen ugalketa traktuan zehar jariatutako bikarbonato ioiak esperman sartzean, adenilato ziklasa (cAMP) aktibatzen dute. → proteinak fosforilatu
- Bikarbonatoak flageloko hainbat kanale aktibatu
- Espermatozoideen mintz plasmatikoko egitura lipidikoan eta glikoproteikoan aldaketak gertatzen dira
- Espermanen metabolismoa, mintzaren jariatutasuna eta mugikortasuna emendatzen da.
- Espermatozoideak erreazio akrosomikoa jasango duela ziurtatzen da.

Dena den, ernalketa gertatzeko, espermatozoideak nolabait erakarri egin behar dira obozito horretara. Erakarpenean hori zenbait proteina bereziki bidez ematen da, eta proteina hauek zelula folikularrek sortzen dituzte: normalean proteina txikiak edo peptidoak izaten dira, ugaztunen kasuan jariatutako faktoreen bat (**progesterona**) izaten da.

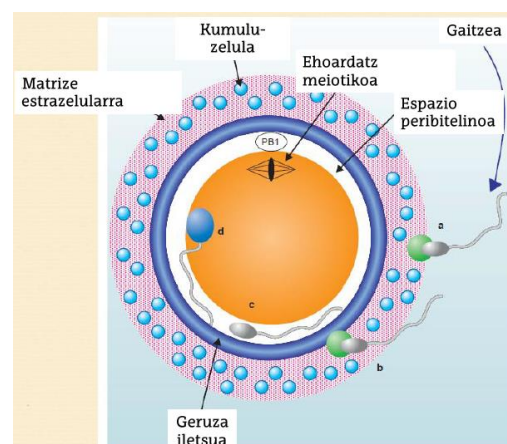
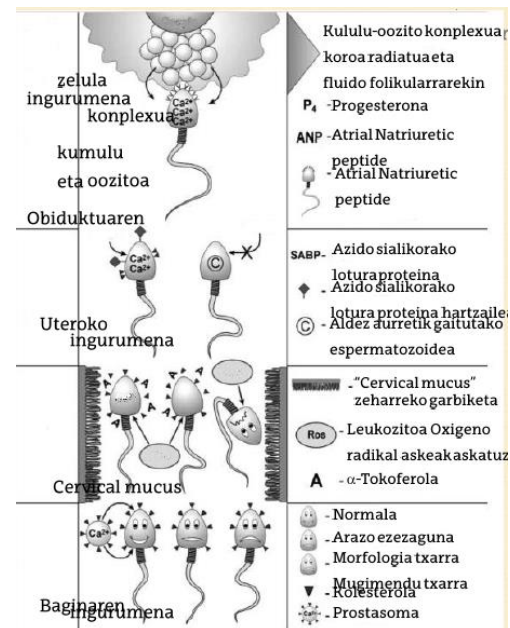
Behin espermatozoideak aldaketak jasan ondoren, obozitoek sortutako peptido horiekiko sentikorrak direnez, obozitorantz bidera daitezke, mintzean dituzten zenbait hartzailek seinalea ezagutuko dute.

### 3.2 Gametoen arteko ezagumendua

Espermatozoidea gaitzean heldu bihurtzen da, mugikorra. Obozitorara erakarri ondoren gametoen arteko ezagumendua ematen da.

Espermatozoideak zelula folikularren geruza zeharkatu behar du. Horretarako, espermatozoidearen “burua” dagoen lekuan, akrosoma deritzon lisosoma bat dago. Lisosoma honek, buruan aurreraka migratzen du bere mintza espermatozoidearekin fusionatuz, eta horrela, zenbait entzima hidrolitiko jariatzen ditu kanpora. Entzima hauek, zelula folikularren geruzan zehar bidea irekitzen dute eta orduan, espermatozoideek zulotxo horretan zehar bidaia dezakete obozitoarekin topatu arte. Prozesu honi, **erreazio akrosomikoa** deritzo.

Espermatozoideak obozitoarekin fusioatzeko, entzima berezi batzuk behar ditu. Ugaztunentzat ez da zaila, barne ugalketa burutzen dugulako; baina itsasoan, bi gametoak aske eta aparte



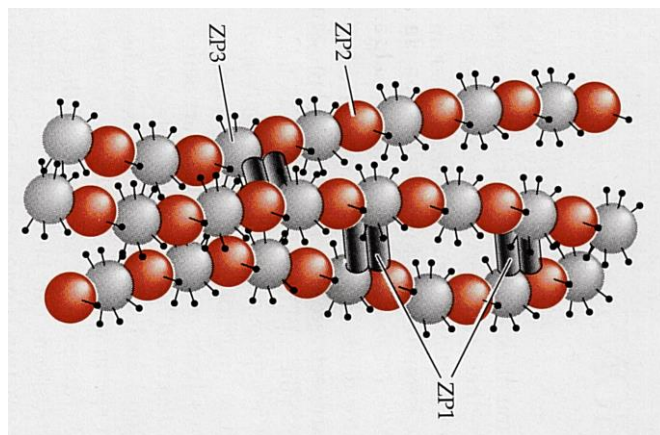


sintetizatzen dira. Hori dela eta, espermatozoidearen eta obozitoaren arteko ezagupen bat eman behar da, espezie berekoak fusioa daitezen.

### Geruza iletsua

Ernalketa interespezifikoa ekiditen duen geruza, “zona pellucida (ZP)” geruza iletsua da. Espermatozoidea hona lotzen da.

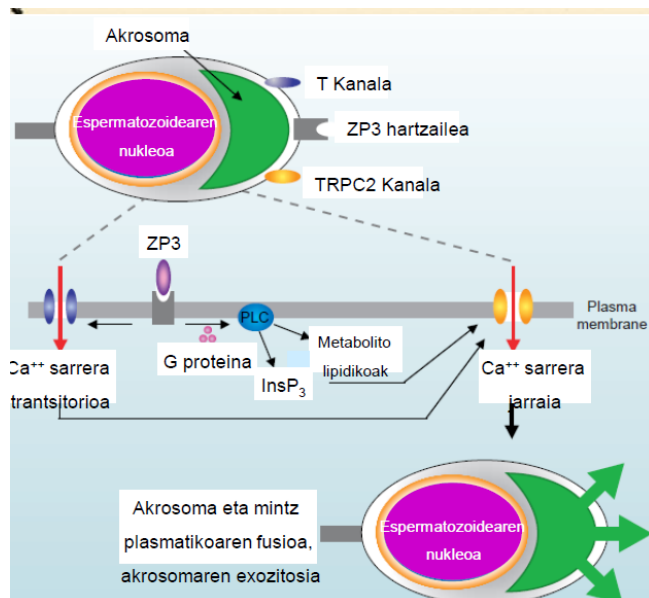
Ugaztunetan, geruza hori obozitoak sintetizatutako hiru glikoproteina osatuta dago: **ZP1, ZP2 eta ZP3** (ZP3-ak espeziearen hartzaile espezifiko gisa funtzionatzen du). Transmintz-proteina hauek, gametoen leku desberdinetan kokatzen dira: espermatozoideetan akrosomaren beheko zatia agerian geratzen denean agertzen dira, eta obozitoetan, beren mintzaren inguru guztian agertzen dira. ZP proteina hauek, espezie bakoitzarekiko espezifikoak dira; hots, bi proteina hauen arteko ezagupena, espezie bereko gametoen artean soilik ematen da.



Filogenetikoki oso gertu dauden espezieak ernaldu daitezke, baina animalia ez bideragarriak sortuko dira (mandoa).

### Erreakzio akrosomikoa:

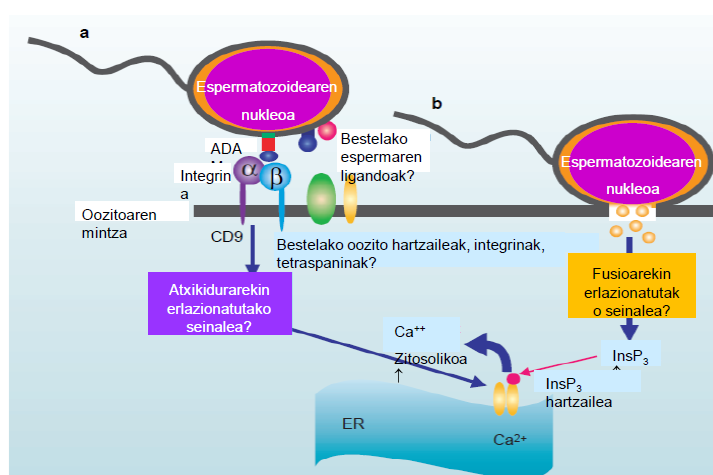
ZP3-rekin proteina-karbohidrato lotura ematen da. Entzima hidrolitikoak (fosfatasa, fosfolipasa A, kolagenasa,  $\beta$ -galaktosidasa...) jariatuz, geruza iletsuan zuloa sortu eta espermatozoidea barrurago sartzen da. G proteinaren bidezko seinalearen trandukzioa egiten da, **kaltzio kanalak** zabaltzen dira eta fosfolipasa C aktibatzen da.



## 4. Mintz plasmatikoen fusioa

Espermatozoideen Fertilina  $\alpha$  (transmintz proteina hau espermatozoidearen mintzera ez-kobalentez lotuta dago eta glikosilatutako bi azpiunitez osatuta dago  $\alpha$  eta  $\beta$ ) edo desintedrina, edo metaloproteasa 1 domeinua (ADAM 1) obozitoaren mintzeko integrinekin lotzen da fertilinaren amino muturra). Lotura hau eman ondoren, obozitoen metabolismoaren aktibazioa gertatzen da.

Mintzen arteko fusioa ematean, espermatozoideak bere pronukleoa -nukleoa -askatzen du (DNAren kopuru erdia daramana!), eta aldi berean, obozitoan, zatiketa meiotikoa bukatzen da (oso azkar). Zatiketa hau,





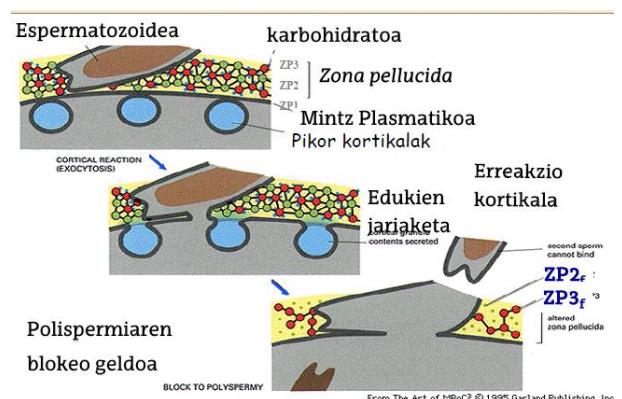
asimetrikoa da itxurari dagokionez; zati oso txiki bat -obozitoaren DNA erdia eta zitoplasma apur bat daramana- eta zati handia -beste DNA erdia eta gainerako zitoplasma osoa darama- sortzen dira. Beraz, espermatozoidea eta obozitoa elkartzen direnean DNA kopuru “normala” duen zelula eratuko dute, zigotoa.

## 5. Polispermiaaren blokeoa

Polispermia obozito bat espermatozoiden bat baino gehiagotatik enaldia denean gertatzen da. Askotan zigotoa ez-bideragarria izaten da.

Blokeo mekanismoak: Erreakzio egokia izan bada, bi blokeoak eman dira

- Blokeo azkarra eta itzulgarria: bi gametoen arteko fusioa gertatu bezain pronto,  $Na^+$  sartzen da eta mintza despolarizatu egiten du. Horrek, gainerako espermatozoiden sarrera blokeatzen du. Karga potentzia aldatu eta espermatozoidea ezin da barrura sartu.
- Blokeo sekundarioa eta itzulezina: espermatozoiden fusioak,  $Na^+$ -rekin batera,  $Ca^{2+}$  kontzentrazioa ere igoarazten du.  $Ca^{2+}$  kontzentrazioaren igoera horrek, **erreakzio kortikala** sortarazten du, hau da, obozitoaren zitoplasman dauden granulu batzuk (pikor kortikalak) mintz plasmatikorekin fusionatu eta beren materiala askatzea eragiten du.



Askatutako material horretan entzima hidrolitikoak daude, eta entzima horiek zona pellucidako ZP2 eta ZP3 proteinak desantolatzen dituzte, egiturak aldarazten dizkiete. ZP-ak aldatu egin direnez, ez da ezagupenik ematen.

Polispermiaaren 2. blokeo hau geldoagoa den arren, itzulezina da.

## 6. Obozitoaren metabolismoaren aktibazioa

Espermatozoiden sarreraren  $Ca^{2+}$  kontzentrazioaren aldaketak, erreakzio kortikala sortarazten du eta obozitoaren aktibazioa eragiten du. Inositol trifosfatoaren bidez, EEP-ko kaltzio kanalak ireki eta  $Ca^{2+}$  zitoplasmara askatu.

Obozitoa martxan jartzeak, zelula hori zatitzen eta konplexuago bihurtzen hasiko dela suposatzen du. Honako aldaketa hauek ematen dira:

- $O_2$  ren kontsumoa handitzen da, eta horrek  $NAD^+$  kinasaren aktibazioa dakar.
- Polispermiaaren blokeoa gertatzen da.
- DNA eta proteinen sintesia pizten da. → Amak obozitoan jarritako RNAm
- Mikrobilosken gainazala galtzen da. → espermatozoidari heltzen diote. Erreakzio tokian mikrobilosken hazkuntza izugarria ematen da. Fertilizazio konoa sortzen dute espermatozoiden inguruan. Ez da galera, antolaketa oso homogeneo batetik espezifikora pasatu da.
- Zitoplasmaren berrantolaketa ematen da.

Zelula bideragarria sortzen da orduan, zigotoa. Hemen, obulu eta espermatozoiden pronukleoak hurbiltzen dira baina ez dira lotzen.

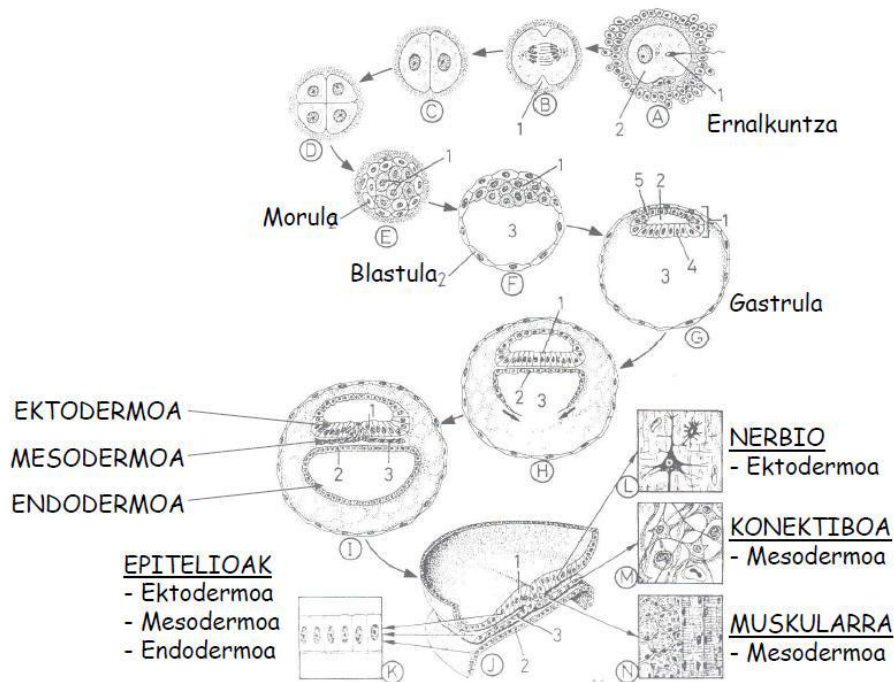
Behin ernalkuntza gertatu ondoren, etengabeko zatiketei ematen zaie hasiera. Inolako hazkuntza zelularrik gabeko zatiketak gertatzen dira, hots, zelulen tamaina ez da handitzen. Ondorioz, bukaeran, hasierako zelularen tamainako enbrioi bat daukagu baina zelula txiki gehiagoz osatua.

Zelularen S eta M faseak soilik gertatzen dira prozesu hauetan. Ernalkuntza gertatu ondoren, beraz, zigotoa etengabe zatitzen hasten da, eta prozesu horretan, fase hauek bereizten dira:

- Zigotoak hainbat zatiketa jasan ondoren, **morula** itxura hartzen du. Hau, zelulez betetako pilota bat da; normalean, 16-32 zelula bitartez osatutakoa.
- Geroago, zelula hauek izkinatara migratzen dute eta erdialdean barrunbe bat geratzen da. Sortzen den egitura honi **blastula** deritzo, eta hau osatzen duen zelula bakoitzari, **blastomero**. Erdian geratzen den barrunbeari, berriz, **blastozelea**.
- Zelula hauek zatitzen jarraituko dute, bakoitzetik geroz eta zelula txikiagoak sortuko direlarik. Ondoren, blastomeroak migratzen hasiko dira barrurantz beste barrunbe bat osatuz: **arkenterona**. Egitura berriari, **gastrula** deitzen zaio. 2 lerro zelular lortu.

Jada, horri enbrionarioak sortzen hasten dira zelula batzuk barruan eta besteak kanpoan kokatuz. **Barruko zelulek** (arkenterona eta blastozelearen artean geratzen direnek) **endodermoa** osatzen dute. Zelula hauek, espezializatzean, liseri aparatua, hestea, gibela... emango dituzte. **Kanpoaldean** kokatzen diren zelulek, berriz, **ektodermoa** osatzen dute eta gero, hemendik, larruazala, nerbio-sistema... garatuko dira. Pixka bat beranduago, **3. geruza** sortzen hasiko da: **mesodermoa**. Hemendik muskulu zelulak garatuko dira.

Jada, 3 orri/geruza enbrionario nagusi bereizten dira. Hortik zelulak desberdintzatzen hasten dira, ehun, aparatu eta organo desberdinak emateko.



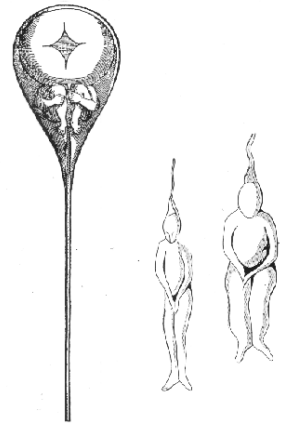
## 4. Ehunaren kontzeptua

### 1. Definizioa

1695. urtean, Nicolaas Hartsoeker-ek adierazi zuen espermatozoidearen barruan pertsona txiki bat zihola eta obuluarekin elkartzean hortik gizakia jaiotzen zela.

1839. urtean Schwann eta Schleidenek teoria zelularra proposatu zuten. Teoria honek, hiru ideia nagusi zituen:

- Bizidun eta organismo guztiak zelulaz eratuta daude.
- Zelula oro, beste zelula batetik dator.
- Zelulek, **bizitza bikoitza** dute: zelulari berari dagokion funtzioak betetzeko, bizirik jarraitzeko; eta, zelula organismoaren parte izatearen ondorioz, dituen funtzioak betetzeko. Organismo osoak ondo funtzionatzeko, ehunak antolatzen dituzte.



### 2. Zigotoaren polarizazioa

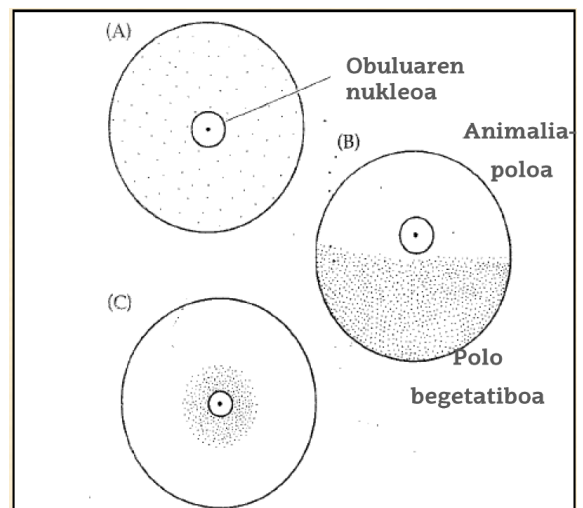
Zigotoa animaliz animalia aldatzen da. Garapena arrautza barruan egiten den animalietan, beharrezkoa da barruan erreserba materiala izatea, hau biteloa da. Animalia-espezie desberdinen arrautzetan metatzen den bitelo kantitatea oso desberdina da. Ezaugarri hau estuki erlazionatuta dago animaliak izango duen garapen enbrionarioarekin.

Biteloaren kantitatearen arabera hurrengo arrautza-motak bereizten dira:

- Arrautza alezitikoak: bitelarik gabeko arrautzak dira
- Arrautza oligolezitikoak: bitelo-kantitate txikiko arrautzak dira
- Arrautza mesolezitikoak edo hololezitikoak: bitelo-kantitate ertaineko arrautzak
- Arrautza telolezitikoak: bitelo-kantitate handiko arrautzak

Biteloaren kokapenaren arabera ere sailkatu daitezke:

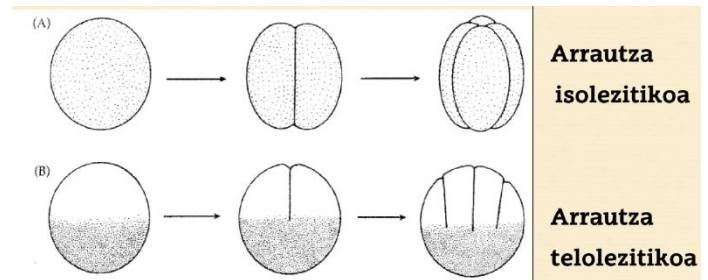
- Isolezitikoak: biteloa arrautza osoan modu homogeneoan banatuta dagoenean. (A)
- Telolezitikoak kasuan, arrautza ez da guztiz borobila izango, polarizatuta dago. Grabitatearen ondorioz, bitelo asko metatzen da behealdean. Honi **polo begetatiboa** deritza. Bitelarik gabeko poloa **animalia poloa** da. Gainera, zigotoa bereizten doanean, hasiera hasieratik zelula desberdinak sortuko dira eta karga desberdina izango dute. Zenbait organismotan, biteloaren kantitate eta kokapenaren arabera, zelulek jakin mota batekoak edo bestekoak. (B)
- Zentrolezitikoak (C)



### 3. Lakainketa

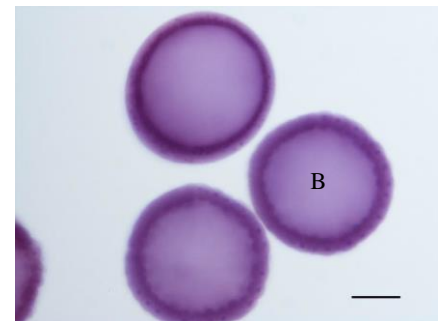
Zigotoaren zatiketa. Lakainketa-motak biteloaren kantitatearen eta banaketaren arabera: holoblastikoa (A) eta meroblastikoa (B).

- Arrautza isolezitikoetan, zatiketa homogenea.
- Arrautza telolezitikoetan hasieran zatiketa erdiraino egiten da eta osorik zatitzean zelula desberdinak sortuko dira.



Zelula bat desberdintzatu gabe dugu. Biteloaren kantitate eta kokapenaren arabera zelula desberdin bihurtuko da. Isolezitikoaren kasuan, morula eratzean, hemengo zelula guztiak berdinak. Zatitzen jarraitu eta blastula eratuko da. Hemen mota desberdinak daude. Zatitzen jarraitu eta blastulako zelula batzuek barrurantz migratuko dute. Orduan gastrula eratuko da. Garapenaren hasieran, zelulak ez dira hazten, ez dituzte G1 eta G2 faseak egiten, soilik zatituz doaz.

Arrautza-mota	Lakainketa-mota	Blastula-mota	Adibidea
Isolezitikoa	Holoblastiko berdina (erradiala)	Zeloblastula	Ekinodermoak
Isolezitikoa	Holoblastiko desberdina (espirala)	Estereoblastula	Anelidoak Moluskoak
Mesolezitikoa	Holoblastiko desberdina (erradiala)	Zeloblastula	Anfibioak
Telolezitikoa	Meroblastikoa (diskoidala)	Diskoblastula	Arrainak Narastiak Hegaztiak
Zentrolezitikoa	Meroblastikoa (superfiziala)	Periblastula	Intsektuak



Itsas-izarraren blastula fasea. B: blastozela.  
Eskala: 50 µm

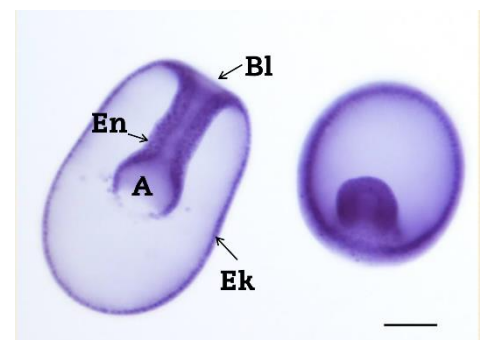
#### 4. Gastrulazioa

Blastulatik gastrula sortuko da. Egitura berezi bat eratzen da eta bertako zelulek, nahiz eta informazio osoa izan, beraien kokapenaren ondorioz zelula desberdinetan garatuko dira; adibidez, ektodermoa eta endodermoa osatuko dute. Lehen gastrula fasean, kanpoaldean agertzen diren zelulek osatuko dute, bigarrena, aldiz, arkenterona eratzean barneratzen diren zelulek.

Beraz, zelulak determinaturik daude. Ehuna sortzerakoan, zelulek alde aurretik bedakite beraien etorkizuna.

- Ektodermoa: larruazaleko zelulak, neuronak, pigmentu zelulak
- Mesodermoa: globulu gorriak, muskulua
- Endodermoa: pankreako zelulak, tiroide zelulak

Enbrioia garatu ahala, zelulak gero eta espezializatuagoak izango dira.



Itsas-izarraren gastrula fasea. A: arkenterona; Bl: Blastoporoa; Ek: ektodermoa; En: endodermoa. Eskala: 50 µm

#### 5. Garapen mekanismo zelularrak

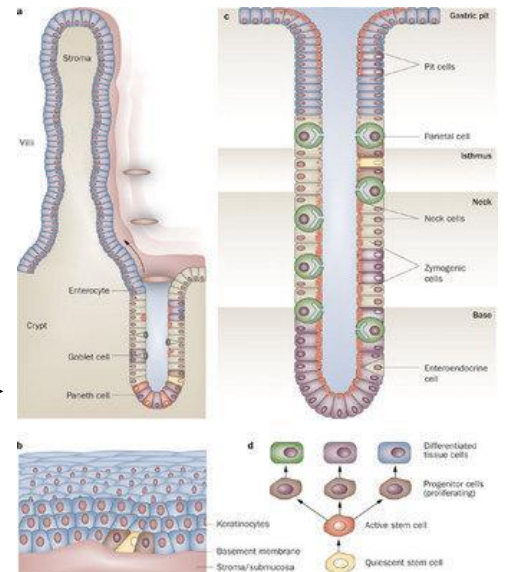
Zelulen berriztapena ez da soilik enbrio fasean gertatzen, zelula helduak ere berriztatu egin behar dira; adibidez, hesteko liseri zelulak. Hestean liseriketa prozesua burutzen dutenak dira. Zatitu eta desberdintzatu egiten dira, egitura berriro eratuz. Zelula horien funtzioa zatitzea da.



Baina, zelula bat zatitzen hasten denean, nola jakingo du zein zelula bihurtu behar den?

Honetarako oroimen zelularra dago, zitoplasmatikoa eta nuklearra. Izan ere, zelula guztiek genoma komuna dute, baina, geneen adierazpen diferentziala dago, proteina batzuk sintetizatzeke gene batzuk bakarrik daude aktibo, besteak isilarazita.

Lau irudiz osatutako panel honetako A, B eta C irudiek zelula desberdintzatutako eta desberdintzatu gabeko ama zelulak erakusten dituzte, traktu gastrointestinalaren hiru gune desberdinetan: hestea, esofagoa eta urdaila. Funtzio desberdina duten zelulak, kolore desberdinetan adierazita daude, beraien artean zein zelula amekiko bereizteko. D irudiak ama zelula baten aktibazioa eta hortik zelula progenitoreak sortzerainoko bidea erakusten du. Hauek gero, ehuneko zelula desberdintzatu bihurtuko dira. Berdez dauden zelulek polisakaridoak sintetizatu eta jariatu, ehuna hidratatu.

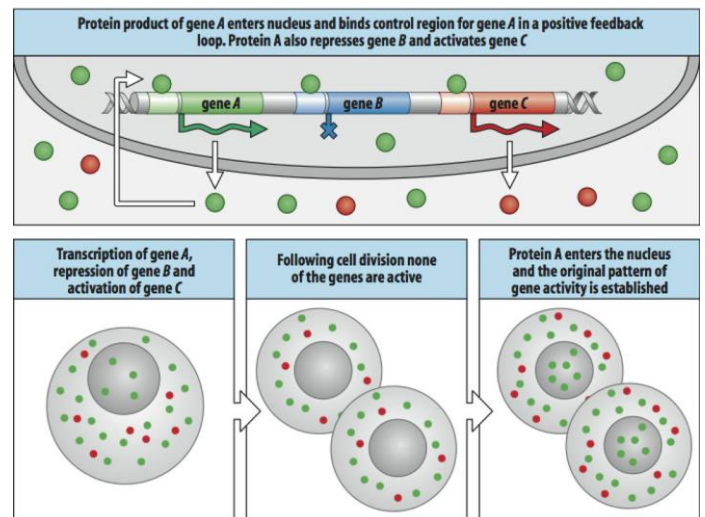


Adibidez, A, B eta C geneak ditugu. A genearen proteina produktua nukleora sartzen da eta A genera itsasten da. A proteinak B genea isilarazten du eta C genea aktibatzen du. Beraz, zitoplasman A eta C proteinak izango ditugu eta nukleoan A proteina, transkripzioa aktibatzen duena.

Zelula zatitu behar denean, prozesu guztiak gelditzen dira, baina zitoplasman produktuak daramatza. Orduan bi zelula alaba sortuko dira. Zelula alaba horietan, A produktuak, nukleora sartzean, A eta C geneak aktibatuko ditu.

Zelula alabek A eta C geneak, amaren desberdintzapen patroia eta amaren DNA daramatzate.

- DNA deskondentsatu eta berantolatu → zelula alabek zitoplasma amaren A eta C proteinak dituzte
- Berreskurapenean, DNA deskondentsatzean, B genean blokeatuta

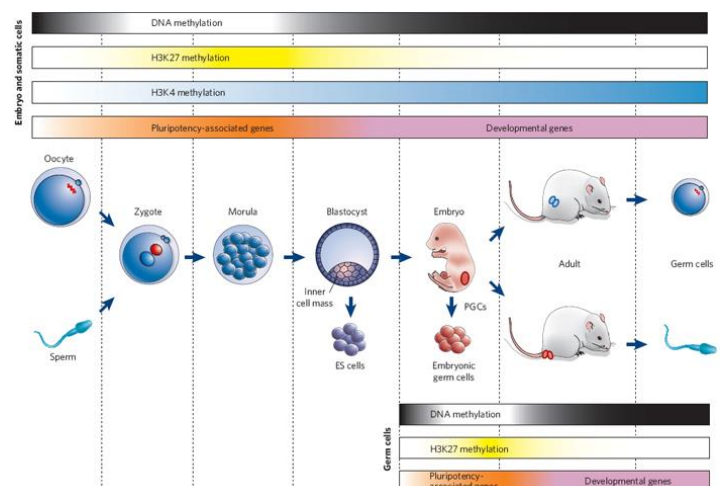


A molekulak sortzen duen blokeo mekanismoaz gain, beste modu batzuk ere badaude, zelula modu batera edo bestera desberdintatzera bultzatzen dutenak:

## 5.1 DNA metilazioa

DNA-ren sekuentzia jakinda, zelula batzuetan CH3 gehitu daiteke (zitosinetan). Hauek oso metilatuta badaude, DNA kondentsatzean, gene horiek isilarazi egingo dira eta ez dira adieraziko.

Zatiketa zelularra ematean, metilazioa ere kopiari egingo da eta zelula alabek ere gene berak metilatuta izango dituzte. Honek, gene batzuk errazago adieraztea eragingo du beste batzuk baino.

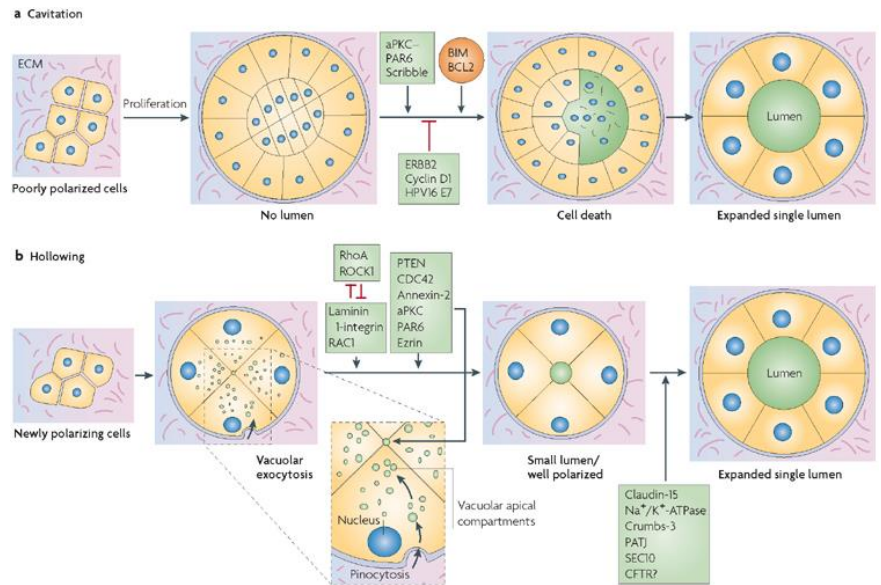


Gastrulazio fasera iristen direnean, jada metilazio patroia agertzen da eta zelulek ezin dituztenez gene denak adierazi, desberdintzatzen hasten dira, espezializatzen.

Zelula germinalean desmetilazio prozesua ematen da, askotan gene denak beharrezkoak direlako.

Zelulek haien artean seinaleak bidaltzen dira, eta hauen aurrean interakzionatzen dute. Zelula berdinek etengabeko seinalizazioa jasaten dute hasieratik, eta hauen arabera zelula desberdinak eratu daitezke. Nahiz eta bide desberdina jarraituko duten, zelula hauek osatzen duten amaierako egitura berdina izatea gerta liteke.

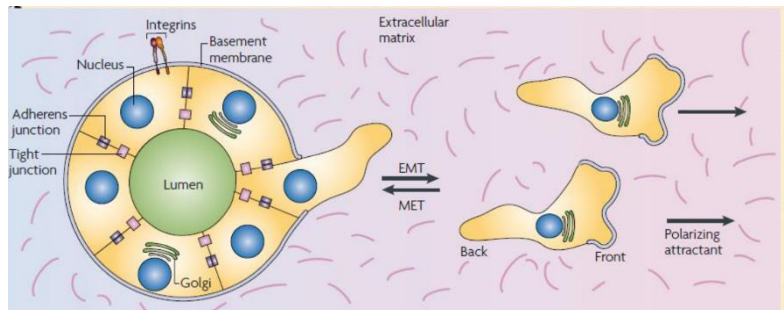
Lehen kasuan, zelulak asko zatitu eta zelula masa bat eratzen dute, erdialdeko zelulak hil eta lumena eratu. Bigarren kasuan, zelulak ez zatitu hainbeste. Lumena pinozitosi bidez eratu.



## 5.2 Ehunetako osagai estrazelularrak

Zelulak matrize batez inguratuta daude eta honen konposizioak beraien garapenean eragingo du.

Matrize estrazelularra, ehuna eratzen duten zelulek kanpo mediora jariatzen duten sustantzia da, eta ehunetako zelulen jokabidea erregulatzen dute: garapena, migrazioa, proliferazioa, forma, metabolismoaren funtzioak... Batez ere, ehunaren funtzionamendua koordinatua izan dadin arduratzen da.



Matrizea oso heterogeneoa da ehun desberdinetan, baina orokorrean, bere osagaiak **kolagenoa**, **elastina**, **glikosaminoglikanoak** (GAG), **proteoglikanoak**, **fibronektinak** eta **laminina** dira.

Laburbilduz, beraz, ME-ak:

- Ehunaren integritatea mantentzen du.
- Organismoaren barne medioaren eta ehunetako zelulen artean metabolitoak, elikagaiak... zabaltzen ditu.
- Desberdintzapen zelularrean parte hartzen du.

Ehunetan, zelula mota desberdin ugari daude, eta hauek, zigototik abiatuz, desberdintzapen zelularren bitartez eratzen dira. Izan ere, gure zelula guztiek DNA kopia osoa daramate. Ziklo zelularreko S fasean, DNA hori kopiatu eta zelula alabei pasatzen zaie. Gure organismoan ordea, zelula mota desberdin ugari ditugu, eta guztiek ez duten berdin funtzionatzen. Adibidez, ez dira berdinak, neuronak, hepatozitoak, edo odoleko zelulak.

Hori baldintzatzen duena geneen espresioa da. Zelula guztietan DNA osoa daukagun arren, zelula bakoitzaren arabera gene batzuk adieraziko dira eta beste batzuk ixilik egongo dira. Zelula bakoitzak,

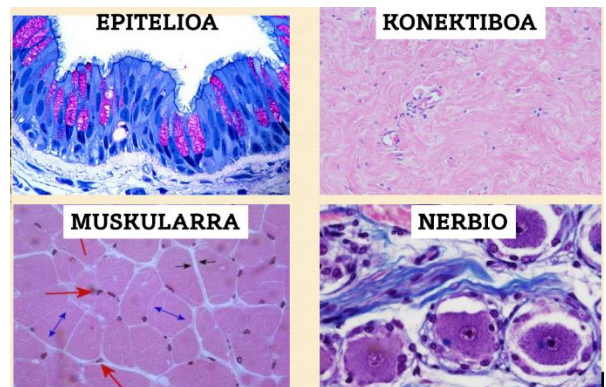
gure genoma osotik gene batzuk soilik erabiltzen ditu. Aukera du beste geneak adierazteko, baina soilik beharrezkoak dituenak espresatzen ditu. Horrek zelularen funtzioa mugatzen du.

Desberdintzapen zelularra prozesu itzulgarria izan daiteke behar bezalako seinaleak agertzen direnean (seinale hauek matrize estrazelularretik datoz). Oso mekanismo ohikoa eta erregulatua. Transmintz proteinei esker, integrinei esker, seinale batzuk heltzean epitelioak askatu, zelula mesenkimatikoa bihurtu eta bere funtzioa aldatu.

### 5.3 Ehun motak

Zelulak taldeetan antolatzen dira ehunak sortuz. Ondoren, ehun horiek elkarrekin konbinatuz organoak sortzen dira eta hauen konbinazioz edo ehunak berak bakarrik, aparatuak eratzen dituzte. Larruazala, adibidez, aparatu oso bat da, ehun epitelial moduan antolatzen diren zelulez osatua.

Animalioak, 4 ehun mota desberdin ditugu: epitelio ehuna, ehun konektiboa, muskulu ehuna eta nerbio ehuna. Gorputzerako beharrezkoak diren funtzio desberdinak betetzen dituzte. Adibidez:



- **Epitelioak:** jariapen, xurgapen, babes funtzioak ditu. Zelula polarizatuak, alde basala eta apikala.
- **Konektiboa:** euskarri, betetze eta babes funtzioak ditu. ME garrantzitsua
- **Muskularra:** organismoaren higiduraz arduratzen da.
- **Nerbio ehuna:** nerbio inpultsuen transmisioaz arduratzen da.

EHUNA	EZAUGARRIAK	MOTAK	JATORRI ENBRIONARIOA
Epitelioa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matrize estrazelular eskasa</li> <li>- Xafla basala</li> <li>- Zelula polarizatuak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gaineztadura</li> <li>- Sentsoriala</li> <li>- Garraio-epitelioak</li> <li>- Bakuna</li> <li>- Geruzatua</li> <li>- Pseudogeruzatua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ektodermikoa</li> <li>- Mesodermikoa</li> <li>- Endodermikoa</li> </ul>
Konjuntiboa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matrize estrazelular ugaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Konjuntiboa</li> <li>- Kartilago</li> <li>- Hezurra</li> <li>- Odola (barne-medioa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesodermikoa</li> </ul>
Muskularra	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Xafla basala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muskulu ildaskatua</li> <li>- Muskulu leuna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesodermikoa</li> </ul>
Nerbio-ehuna	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Xafla basala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuronak</li> <li>- Glia zelulak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ektodermikoa</li> </ul>

### 5.4 Ehunaren oinarrizko ezaugarriak

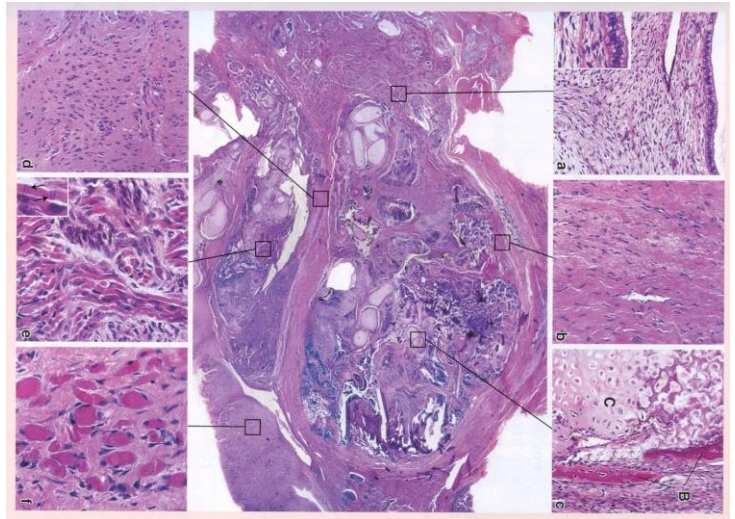
- Lerro zelular batetik desberdintzatu dira; mesodermotik, ektodermotik eta endodermotik hain zuzen ere.
- Bertako zelulak elkarrekin asoziatuta daude; elkarren artean komunikatuta daude eta unitate bakar bat gisa joka dezakete.
- Zelula hauen artean, sustantzia estrazelular komuna dago.
- Oinarrizko zeregin komunak betetzen dituzte, BAINA zelula bakoitzaren funtzioa berezia izan daiteke. Adibidez, *nerbio ehuna*. *Inpultsu nerbiosoak garraiatzeaz neuronak arduratzen diren arren, glia zelulek neuronak babesten dituzte. Bi zelula mota hauek beraien artean asoziatuta daudenez, zeregin komun bat dute.*
- Organo, sistema eta aparatuta antolatuta ager daitezke.



### 5.5 Teratomak

Zelulak haien artean ez badira ondo garatzen sortzen da. Ehun egitura bat da, behar ez den tokian agertzen dena eta behar ez den funtzioa betetzen duena. Egitura bereziak. Ehuna garatzeko bidean, toki berean mantendu eta hazi behar dira, oso prozesu erregulatua. Zelulak momentu zehatzetan eta modu zehatzetan desberdintzen dira. Prozesu honetan arazoak badaude sortzen dira teratomak.

Mesodermoan edo ehun enbrionarioan mutazio bat jasan dutenean, zelula multzo desberdintzatu bat eratzen da, ehunarekin zerikusirik ez duena eta ez funtzionala → organismoa hil daiteke.





## 5. Epitelio ehuna

### 1. Epitelioaren kontzeptua.

#### 1.1 Ezaugarriak

- Zelulak elkarren artean estuki lotzen direnean sortzen den geruza batek edo hainbatek osatzen dute.
- Lotura konplexuen (desmosomak, lotura hertsia, interdigitazioak...) bidez elkarren artean konektaturik daude, modu horretan epitelioaren egitura mantenduz
- Xafla basalaren gainean finkatzen dira
- Zelula epitelialen artean ez dago ia substantzia interzellularrik (ehuneko zuntz eta zelulak elkarturik mantentzen dituen matrice estrazelularrik).
- Odol-fluxu zuzenik gabe (baskulatu gabeak). Ez dago odol-hodirik epitelioaren barnealdean
- Organismoaren kanpo eta barne egiturak estaltzen dituzte eta konpartimenduak mugatzen dituzte.
- Epitelio zelula berriak sortuko dituzten desberdintzatu gabeko zelulak (zelula amak, desberdintzatuek ez dute zatitzeko ahalmenik) dituzte: **berriztapena**.
- Epitelio motaren arabera, zelula mota desberdinak
- Mintzean espezializatuta dauden zelula polarizatuak, mikrobiloska ugariak

#### 1.2 Berriztapena

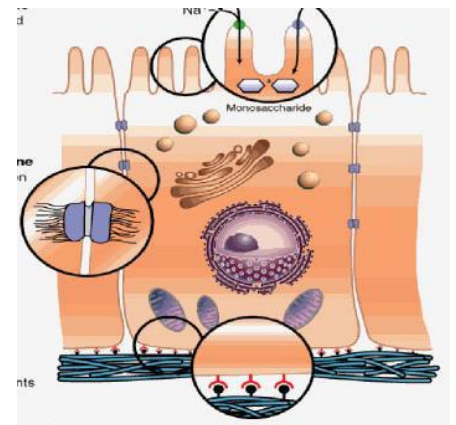
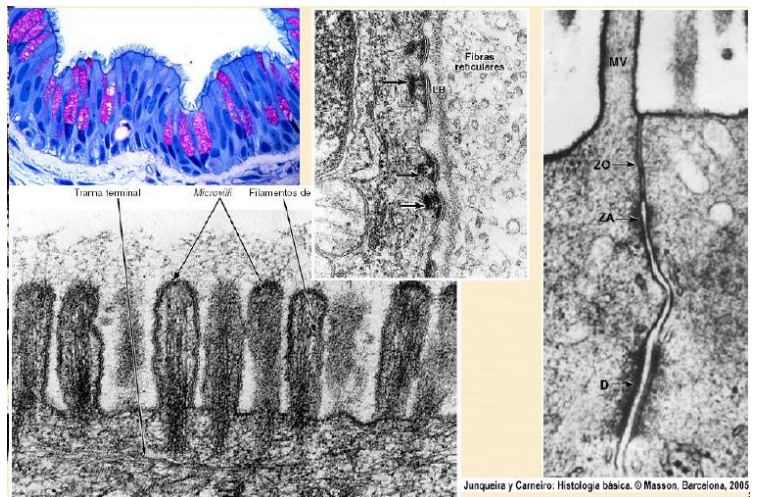
Orokorrean, epitelio mota guztiek **berriztapen tasa oso altua** dute. Bere funtzioa dela eta, zenbait epitelio (epidermisak -larruazala-, liseri-hodiak...) suntsitze tasa oso altua dute, beraz beharrezkoa da berriztapena. Ehunaren berriztapen jarraiturako, epitelio ehunean bertan desberdintzatu gabe dauden zelula batzuk daude, hots, zelula amak. Hauetatik, epitelio zelula berriak sortuko dira, izan ere, ezinezkoa da desberdintzatuta dauden zeluletatik berriak sortzea, hauek zatitzeko gaitasuna galdua baitute.

Epitelioan dauden zenbait keratinozito ez dira zatitzen, keratina berriztatzen dute, baina ez dute nukleorik (globulu gorrien modu berean). Aldiz, epitelioko zelula amak zatitzen dira baina ez dute keratina sintetizatzen.

Berriztapen tasa **oso aldakorra** da: adibidez, gure larruazala etengabe berriztatzen da; 6-8 egunetan, gutxi gorabehera, gure larruazal guztia berritzen da. Geruzaren gaineko kapak hilak daude, keratinaz beteta eta hauek erori egiten dira. Hestean, berriztapena, 2-5 eguneko da, zelula multzo bat dago liseriketa egiten ez duena, ez dituzte zelulak mukiz estaltzen, zelula berriak egin; arean, berriz, 50 eguneko da...

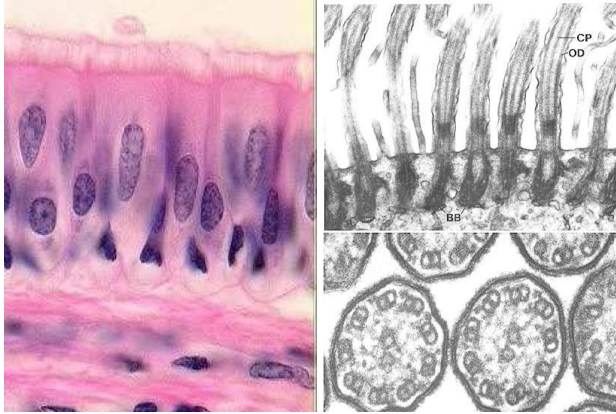
#### 1.3 Polaritatea

Epitelio mota desberdinak daude, eta horren arabera, ehun bakoitzean, zelula mota desberdinak aurkitzen dira. Orokorrean, mintzean espezializatuta dauden **zelula polarizatuak** dituztela esan daiteke; hots, zelularen gune bakoitzean funtzio desberdinak betetzen dira eta horretarako egitura espezializatuak daude.

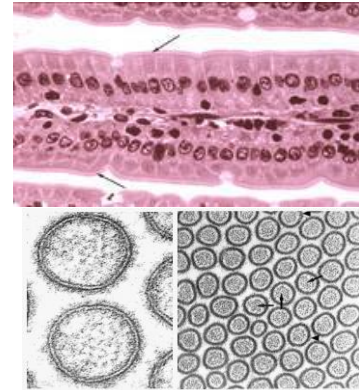


Zelulek ez dute banaketa homogeneo bat, ez dira borobilak, epitelio ehunak, “laukizuzenak” dira, eta alde basala (oinaldea), laterala eta apikala (erpinaldea, goikaldea, aske dagoen azalera) ditu. Zonalde bakoitzean, alde horretako funtzioak bete ahal izateko egitura espezializatuak aurkitzen dira.

- Erpinaldea: zilioak, estereozilioak eta mikrobiloskak



Zilioak

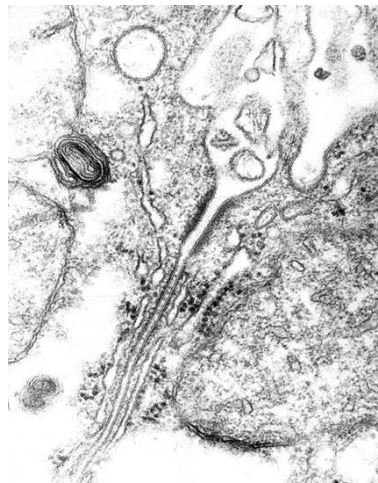


Mikrobiloskak

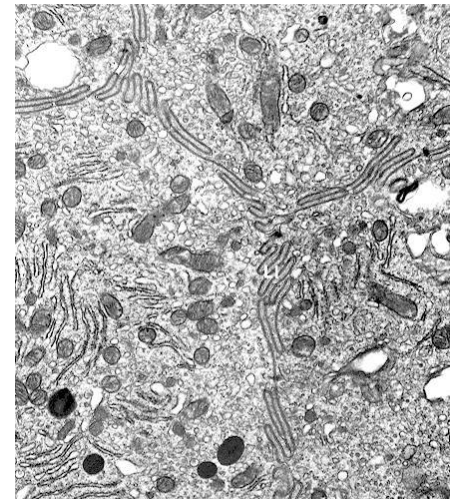
- Laterala: zelularteko loturak (desmosoma, desmosoma trenkadatua) eta interdigitazioak (kontaktu azalera handitu). Hauen bidez, ehun oso zelulek denek batera funtzionatu, modu koordinatuan.



Ornodunen lotura konplexua

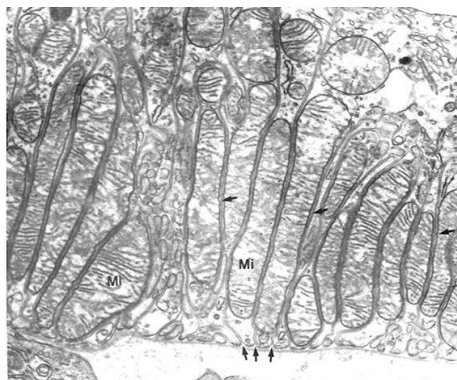


Ornogabeen lotura konplexua

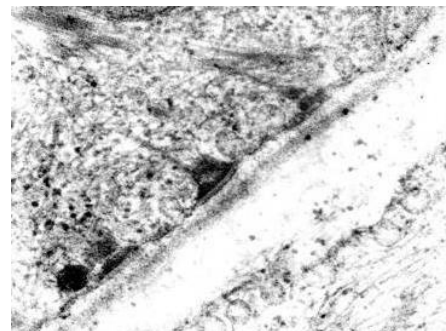


Interdigitazioak

- Oinaldea: ehun konektiboa eta xafla basalarekin kontaktuan dago, eta bertan hemidesmosomak eta oinaldeko tolesturak daude. Hor mitokondrio ugari. Kanpoaldearekiko kontaktu azalera handitu, trukea erraztu.



Oinaldeko tolesturak



Xafla basala,  
hemidesmosomak



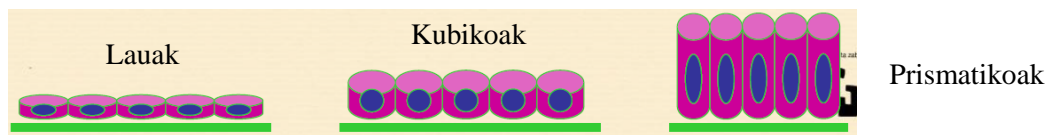
## 2. Sailkapen orokorra

Beren **funtzioaren** arabera:

- Gaineztadura funtzioa dutenak: azalerak estaltzen dituzte
- Guruinak: substantziak jariatzen dituzte, zelulak oso lotuta
- Sentsorialak: estimuluak jasotzen dituzte
- Garraiatzaileak: fluidoak garraioaz arduratzen dira → epitelio denek bete. Osagaiak zelula barrura. Gaineztadura epitelioak gune berezietan kokatu eta funtzio bereziak.

Beren **formaren** arabera:

- Lauak: zabalera handiagoa dute altuera baino
- Kubikoak: zabalera eta altuera berdina dute
- Prismatikoak edo zilindrikoak: altuera handiagoa dute zabalera baino



## 3. Jatorri ontogenikoa

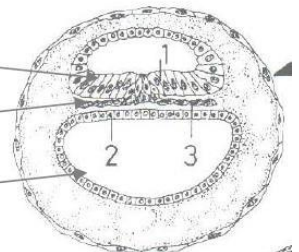
Epitelio ehuna, hiru lerro enbrionarioetatik eratzen da; hots, hiru jatorri desberdin ditu. **Blastomeroak** modu epitelialean kokatu eta polaritatea. Kanpoan/goian/behean osagai desberdinak.

- **Ektodermotik:** epidermisa dator
- **Mesodermoan:** giltzurrun-glomerulu (giltzurrunaren unitate funtzionala da; odola garbitzen den lekua) eta tubuluak, gernu eta ugal hodiak, eta endotelioak dute jatorria
- **Endodermotik:** liseri- eta arnas-hodiak datoz.

**EKTODERMOA**

**MESODERMOA**

**ENDODERMOA**



## 4. Gaineztadura epitelioak

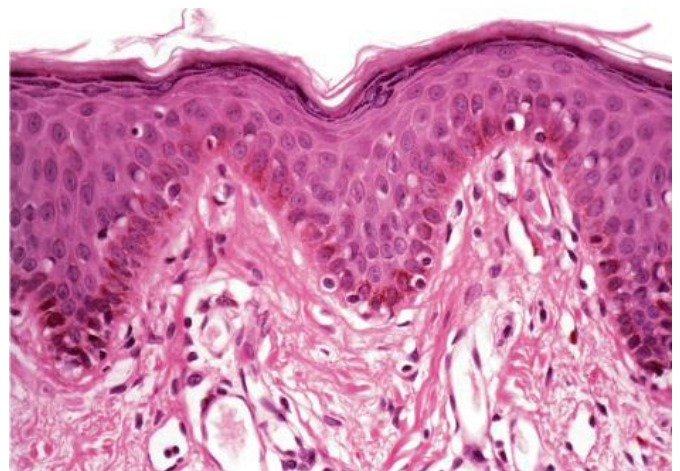
Gaineztadura epitelioa geruza moduan antolatuta dauden zelula lotu eta polarizatuak osatzen dute, eta gorputzaren kanpoko azalera eta barne egiturak estaltzen ditu.

Erpinaldean dituen egituren araberrako sailkapena:

- Zilioak
- Mikrobiloskak
- Keratinizatua
- Kutikula (epitelio zelulek sintetizatua)

Gaineztadura honek dituen **geruza kopuruaren** arabera, honako sailkapena egiten da:

- **Bakuna:** zelulen geruza bakarra duen gaineztadura. Formari dagokionez, lauak, kubikoak edo prismatikoak dira. **Albeoloetan, odol hodietan**
- **Geruzatua:** hainbat zelulen geruzaz osatuta dago, eta denek ez dute xfla basala ukituko. Jatorri ektodermikoa dute eta ornodunetan oso gaineztadura tipikoa da.



Formari dagokionez, lauak, kubikoak edo prismatikoak izan daitezke. Hori jakiteko, xafla basaletik urrunen dagoen geruza aztertuko dugu.

- **Pseudogeruzatuak:** geruza bat baino gehiagoz osatuta daudela dirudi, nukleoak altuera desberdinetan kokatuta baitaude, baina zelula guztiak xafla basalarekin kontaktuan daude.

Erpinaldera, aldiz, ez dira guztiak iristen.

Gaizetadura hau oso tipikoa da arnas bide eta organoetan.

(Mikroskopiotik begiratuta, ez da oso ondo bereizten.

Horregatik,

geruzatua dela esanez gero, ondo legoke).

Formari

dagokionez,

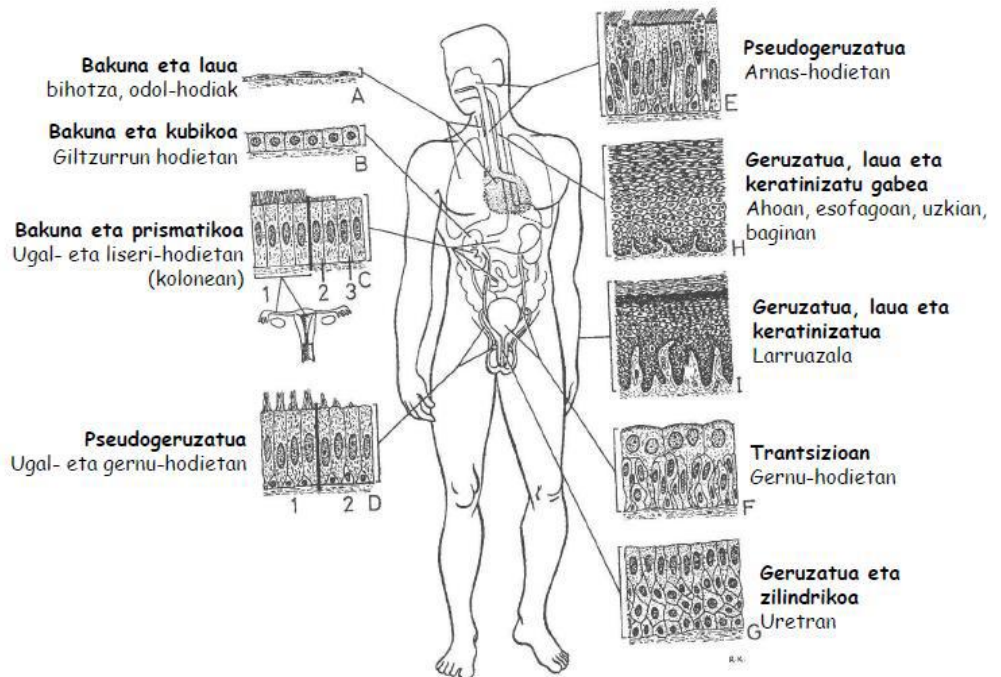
prismatikoak edo trantsiziozkoak

(gunearen arabera eta funtzional egon

edo ez daudenaren

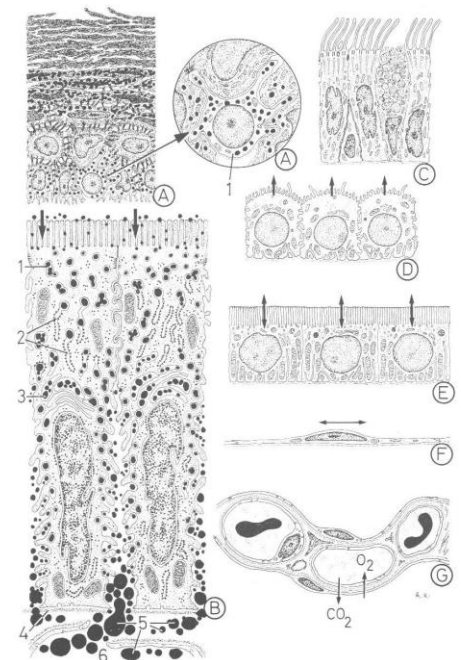
arabera, itxura aldarra dute: inaktibo daudenean, kubikoak dira; aktibo daudenean, berriz, luzatu egiten dira, egitura prismatikoa hartuz, **uretran**) dira.

- Epitelio hondoratua: xafla basalean hutsuneak agertzen dira eta epitelio zelulen nukleoa xafla basalaren azpitik agertzen da. Ehuna xaflan hondoratuta.



#### 4.1 Funtzioak

- Gure gorputza gaizetazari eta babestu → babes kimikoa melanozitoek
- Xurgapena: hesteko gaizetadura prismatiko sinpleak mikrobiloskak. Hauen bidez azalera kontaktua emendatzen da. Mintz sistema xurgapena efizientea izateko prestatuta.
- Zinetikoa: zilioek ingurua mugitzen dute, hondakinak hartu eta kanporatzen dituzte, trakean.
- Jariaketa: zelula kaliziformeek mukiak sintetizatu. Hestean eta kolonean ugari. Babesa eman entzima hidrolitikoek bidez eta hidratatu.
- Iraizketa: giltzurruntan
- Labainketa: zikratizazioa. Zenbait zelula ugaltu eta erraz konpondu apurketa.
- Gasen elkartrukea: epitelio bakun eta geruza fina, ioiek erraz zeharkatzeko.



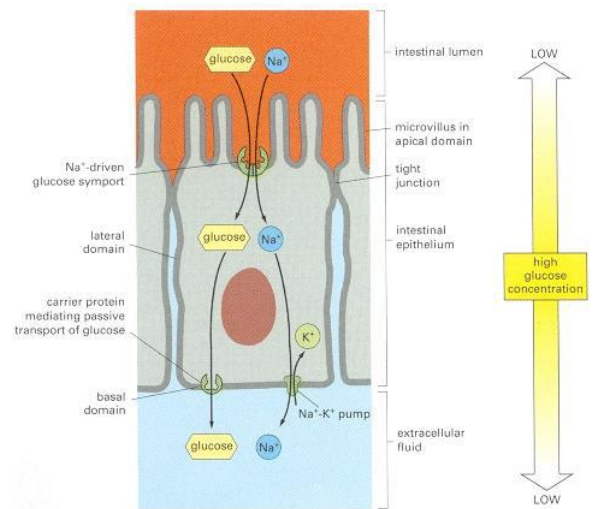


## 4.2 Garraio-epitelioak

Batez ere konpartimentuen arteko garraioa egiten da. Substantzien garraioa eraendu. Zelulak polarizatuta egongo dira, garraioaren norabidearen arabera. Zelula epitelialek muga sortu. Zelulak elkarrengandik oso hurbil daudenez, fluidoan garraioa kontrolatzen dute. Zelularteko lotura konplexuei esker, hermetikotasuna lortzen dute.

Ezaugarri morfologikoak beraien funtzioarekin erlazionatuta daude: gainazaleko espezializazioak (mikrobiloskak, oinaldeko tolesdura, interdigitazioak, zelularteko eremuak) adibidez. Mitokondrioak ere agertzen dira. Mintzean hainbat ponpa daude:  $Ca^{2+} - Mg^{2+}$ ,  $ATP$ asak eta  $Na^+ - K^+$   $ATP$ asak. Hauek garraioaren norabidearen arabera kokapen ezberdina izango dutelarik.

Adibidez, hesteetan heterozitoak agertzen dira. Liseri traktuan, substantziek ezin dute geruza zuzenean zeharkatu, zelulen arteko zuloetan lotura oso estuak agertzen dira eta zeharkatzeko modu bakarra zelula baretik da. Garraio honetarako egitura bereziak daude. Zelula barnean mugitu ondoren, beste garraiatzaile baten bidez aterako dira.



Molekulen garraio askea mugatzen duen egitura.

## 5. Guruin epitelioak

Guruinak: jariapenean espezializatuta dauden epitelioko zelulak edo zelula taldeak

Jariapena: zelulek produktuak sintetizatu eta ondoren zelulatik kanpo askatzen dituzteneko prozesuari deritzo → funtzio nagusia

**5.1 Sailkapena:** itxuraren arabera, jariatzen dutenaren arabera...

- **Endokrinoak:** jariakina barne-mediara (ehun konektibora, zelomara, zirkulazio sistema, hormonak)
- **Exokrinoak:** jariakina konduktu ez-zirkulatorioetara, liseri-traktura (izerdia, esnea, liseri-entzimak) edo kanpo-mediara
- **Anfikrinoak:** jariapen endokrinoak + exokrinoak (area, liseri + odola)

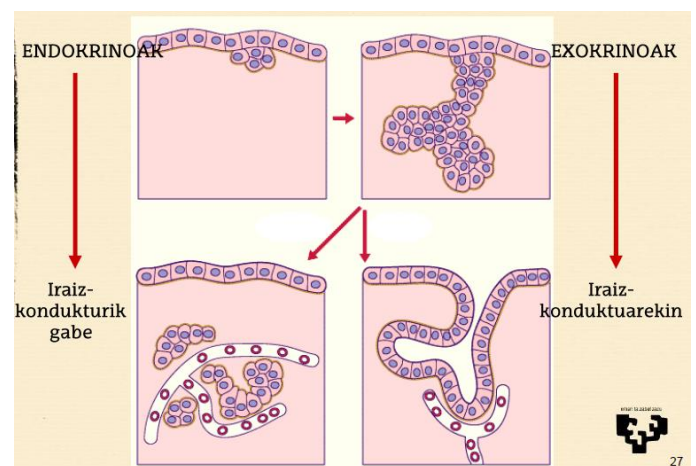
### 5.2 Jatorria

Gaineztadura-epitelioan sortzen dira. Zelulak zatitzen hasten dira eta migratzen. Hauek inguruarekin eta epitelioarekin lotuta jarraitzen badute, exokrinoak. Aldiz, ehun konektibora guztiz migratu eta odol hodiak hauek inguratzen hasten badira, endokrinoak. Baina biak modu berean sortzen dira.

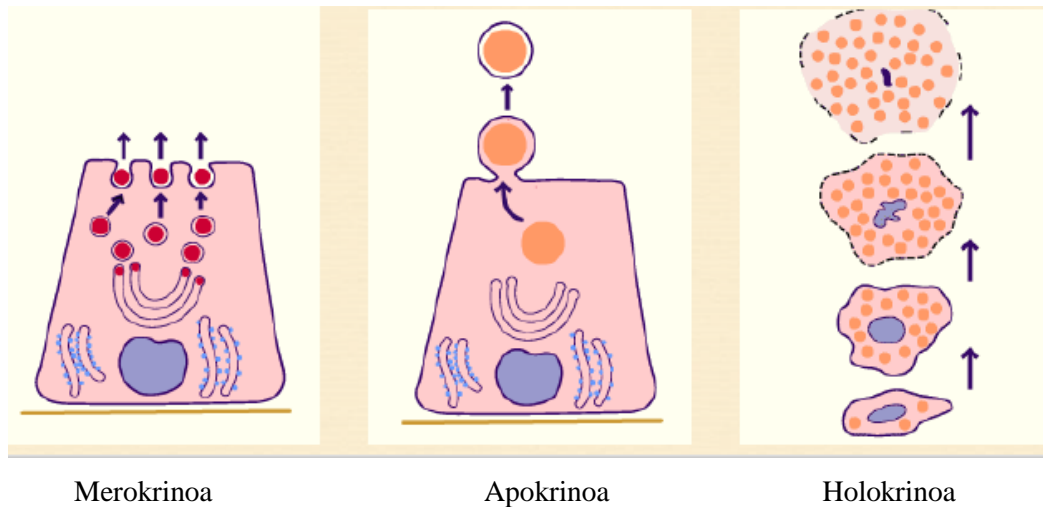
### 5.3 Jariapen mekanismoak

Jariapen mekanismoaren arabera ere sailkatzen dira guruinak:

- **Merokrinoak:** besikulen bitartez, exozitosiz, soilik substantzia edota zitoplasma zati txiki bat.
- **Apokrinoak:** exozitosiz, besikularekin batera, zitoplasmaren zati bat ere galtzen da.



- **Holokrinoa:** jariapen besikulez betetzen da zelula osoa eta dena batera, zelula osoa askatzen da, zelula jada hilda dagoenean.

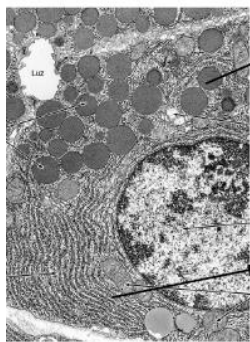


### 5.4 Jariapen-motak

Jariapen motaren arabera, guruin desberdinak:

- **Guruin serotsuak:** proteinak sintetizatu eta jariatuko dituzte. TME-an elektrodentsoak (oso ilun) dira, eta EEP oso garatua dute.
- **Guruin mukitsuak:** polisakaridoak jariatzen dituzte. TME-an oso morfologia aldakorra dutela ikusten da, baina oso gutxitan dira elektrodentsoak. GA oso garatuak dituzte.
- **Guruin seromukitsuak:** aurreko bien nahasketa dela esan dezakegu. Guruin konplexuak, zelula mota bat baino gehiago eta batzuk espezializatuagoak lan batean
- Bestelakoak: oso mota zehatzak → izerdi-guruinak, sebo-guruinak, ugatz-guruinak...

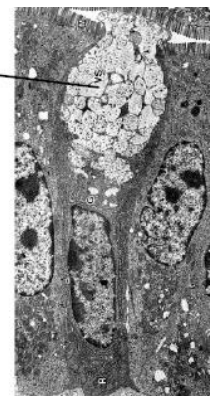
Jariapen serotsua:  
Area



Elektodentsoak  
dira

EEP garatua

Pikorrak  
argiagoak



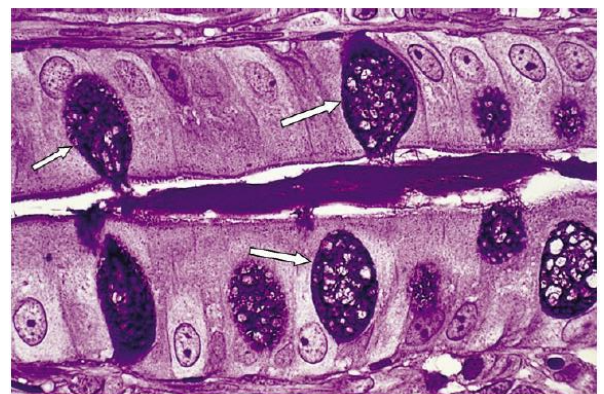
Jariapen  
mukitsua: Liseri  
hodia

## 6. Guruin exokrinoak

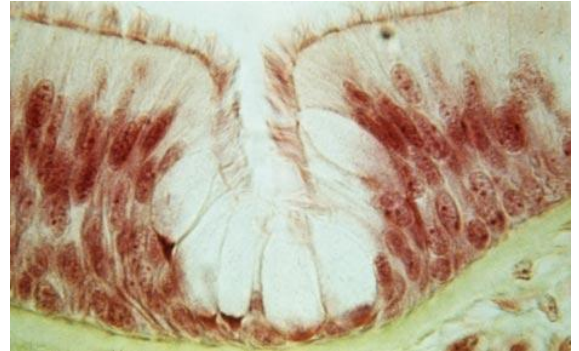
### 6.1 Endoepitelialak

Epitelio barnean daude, eta guruin endoepitelial unizelularrak edo plurizelularrak izan daitezke:

- **Unizelularrak:** zelula kaliziformeez eratuta daude, gaineztadura epitelioan murgilduta daudenak, eta jariapen merokrinoa burutzen dute; zenbait pikor askatzen dituzte.



- **Plurizelularrak:** 6-8 zelula inguruz osatuta daude. Adibidez, sudur mukosa, seromukotsua. Epitelio pseudogeruzatuaren barnean.



## 6.2 Exoepitelialak

Epitelioaren inbaginazio batean daude, epitelioa eratzen duten zelula geruzen azpian. Ehun konektibora migratu eta egitura berezia eratu dute. Hauek ere **unizelularrak** edo **plurizelularrak** (gehienak) izan daitezke.

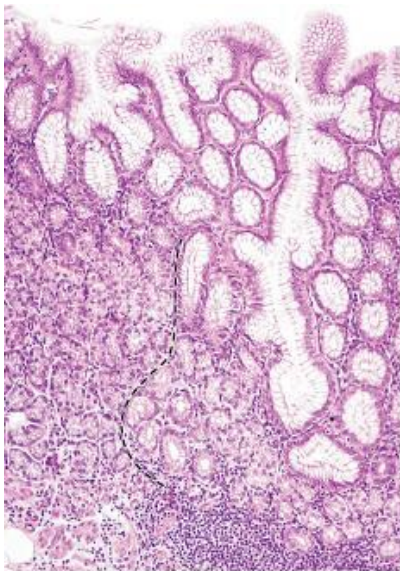
Guruin exoepitelialak, guruin-zelula talde batez eta gainazaleraino doan irteera konduktu batez eratuta daude.

- Konduktua sinplea bada, **guruin sinplea**
- Konduktua adarkatua bada, **guruin konposatua** (adarkaduren barruan adar gehiago)

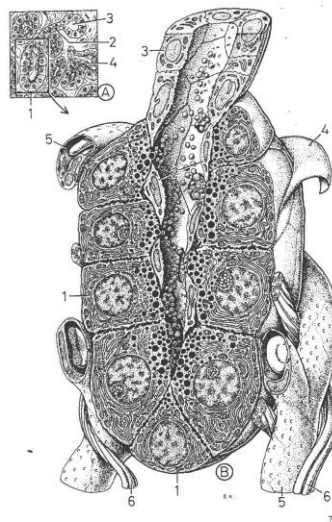
Guruinari dagokion zatia, **tubularra** (zuzena, luzea eta estua), **azinarra** (profil borobildua, tubulu lodiak) edo **albeolarra** (profil irregularra) izan daiteke.

Guruin hauek **sintetizatzen** dutenaren arabera, bi mota bereizten dira:

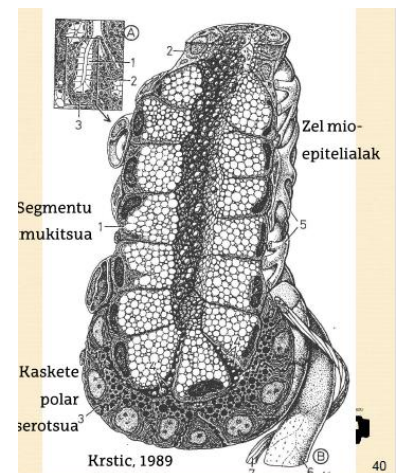
- Guruin **homokrinoa:** zelula mota bakarra sintetizatu eta jariatzen dute (serotsua edo mukitsua)
- Guruin **heterokrinoa:** gutxienez bi zelula mota desberdin sintetizatu eta jariatzen dituzte (seromukotsua edo mukoserotsua).



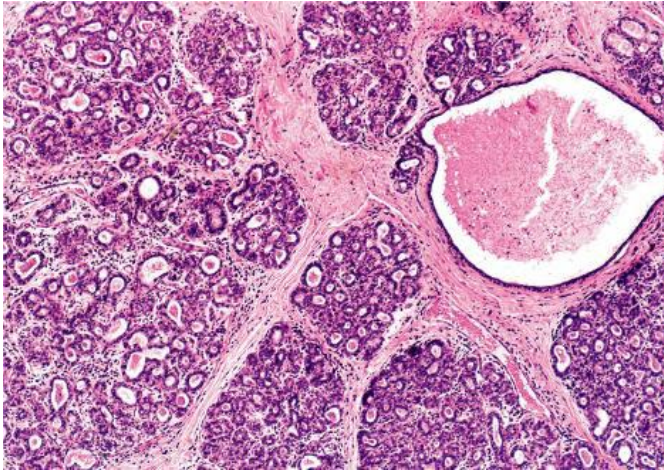
**Guruin exoepitelial sinplea; tubulurra:**  
Urdailean aurkitzen dira, eta guruin heterokrinoa izateaz gain jariatzen merokrinoa dute.



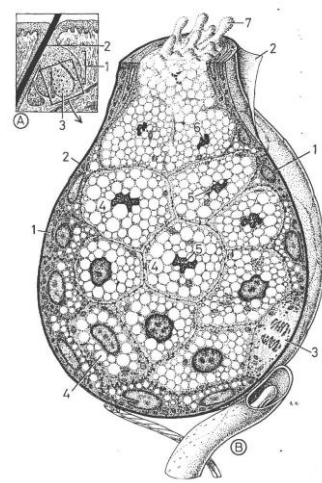
**Guruin exoepitelial sinplea; tubulu-azinarra:** Area exokrinoa, adibidez; jariatzen merokrinoa du. Txistu guruinek, berriz, jariatzen seromukotsua dute (2 zelula mota)







**Guruin exoepitelial sinplea; tubulu-albeolarra:** Ugatz-guruina, adibidez. Jariapen merokrinoa (kaseina) eta apokrinoa (gantzak) du.



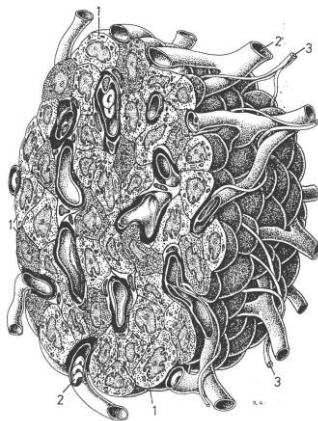
Sebo guruinak, berriz, jariapen holokrinoa du. Zelula gazteak zapalak dira. Ertzetan daudenek ez dute seborik sintetizatzen. Hauek xafla basaletik askatu eta zelularen erdialdean hasi seboa sortzen. Gero zelula osoan bildutako seboa askatuko da.

## 7. Guruin endokrinoak

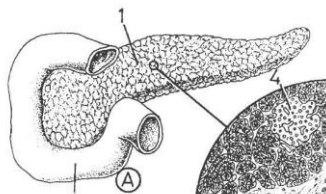
### 7.1 Lokarri zelularrak

Area endokrinoan metaketa moduan agertzen dira, **Langerhans-en irlatxoak**. Metaketa hauek **anfikrinoa** dira. Normalean, sintetizatzen dutena odolera (intsulina, hormonak). Odol hodiak irlen ondoan agertzen dira. Ez dute liseri entzimarik sintetizatu eta jariatzen.

Areak jariapen exokrinoa eta endokrinoa du



Irla osoa



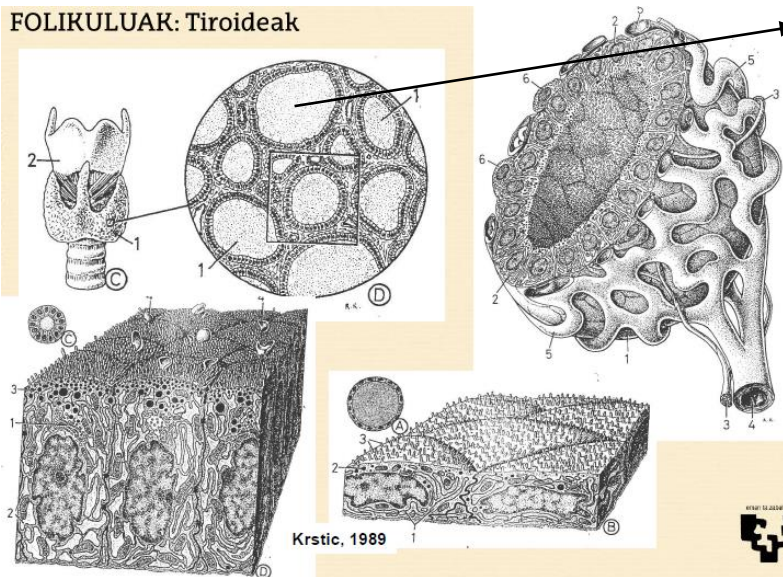
### 7.2 Folikuluak

Tiroideak. Oso odoleztaturik egoten dira, eta horrek jariapena errazten du. Atsedenaldi egoeran dagoenean, estaltzen duten zelulak handiagoak eta estuagoak izango dira. Aldiz, aktibitatea altua denean, folikulua bete eta epitelio zapalagoa eratzen dute.

Zelula zapalak eta hormona ugari daudenean, seinale bat heltzen zaie. Ondoan odol hodiren bat egongo da. Zelula geruza bakar laua denez, erraza da odol-hodira pasatzea.



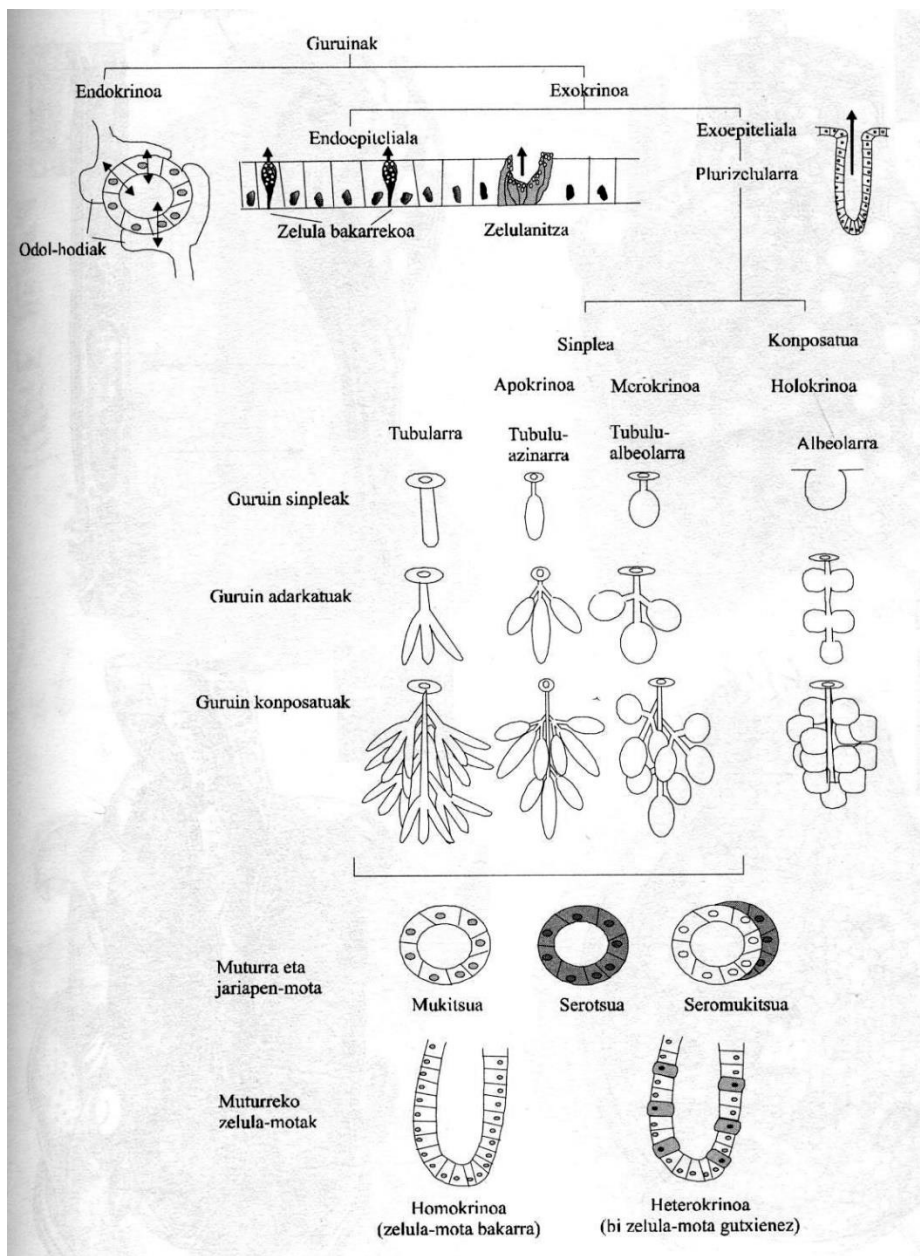
## FOLIKULUAR: Tiroideak



Zelula hauek hormonak sintetizatzen dituzte eta barrunberantz jariatzen dituzte. Barrunbea geroz eta handiagoa izango da.

Inguruan odol hodiak daude, barruko hormonek bidaiaitu behar badute, folikuluen epitelioa zeharkatu eta odol hodietara pasatzen dira jariatutako izateko.

Barrunbeak zenbat eta material gehiago izan, orduan eta leunagoak, homogeneoagoak, izango dira zelulak, metaketan lagunduz eta odol hodietara jariapena erraztuz.



## 6. Ehun konektiboa

### 1. Jatorria, kontzeptua eta sailkapena

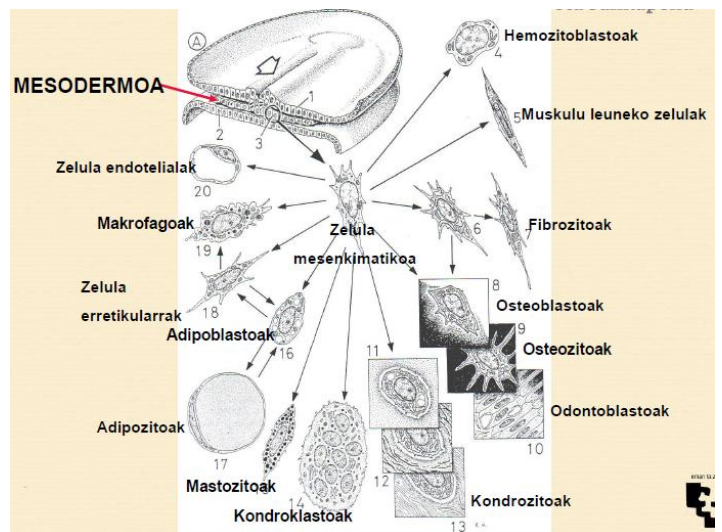
Matrize estrazelularra oso ugaria eta garrantzitsua da. Ehun konektiboko zelula guztiek jatorri berdina daukate: mesodermoa, baina hemendik ez da soilik ehun konektiboa garatzen.

#### 1.1 Ezaugarriak

1. Euskarria da: Funtzio nagusia. Organismoen egitura osoa mantentzeaz arduratu. Bestelako ehunen euskarria (xfla basala, epitelioa... eutsi), hau da, egiturak haien tokian mantentzen ditu. Bai **euskarri fisiko** (hezurrak, kartilagoa) zein **metabolikoa** (hondakinak, erreserba) da, hondakinak garraiatuz eta kanporatuz.
2. Muskulu, nerbio-ehun, odol-hodi eta organo eta ehun guztien estroma (kanpo euskarria) eratzen du.
3. Energia erreserben gordekina: **adipozitoak**.
4. Babes mekanismoetan parte hartu: sistema inmunea. Odola barne sartzen da eta bestetik, ehun konektiboan zehar zelulak mugitu daitezke, bidaiatuz. Beraz, honen egiturak baimentzen du makrofagoak organismoko toki guztietara heltzea patogenoak daudenean

#### 1.2 Osagaiak: Mesodermoa dute jatorria.

- Matrize estrazelularra: zuntzak eta oinarritzko substantziak. Honek erabakiko du ehunaren funtzioa: Kaltzifikatua, euskarri fisikoa; eta ez-kaltzifikatua, betetze ehuna.
- Zelulak: ez dira haien artean hain ezberdinak, baina matrizearen arabera aldaketak izaten dituzte.
  - Finkoak (mota desberdinetakoak ehun konektibo motaren arabera).
  - Migratzaileak (odol zelulak adibidez).



#### 1.3 Jatorria

Mesodermoa enbrio mailan zelula mesenkimatikoa dago, honek desberdintzapen oso txikia dauka. Hau desberdintzatzen hastean, hemendik sortzen diren zelula berriak: muskulu leuneko zelulak, **fibroblastoak**, **osteoblastoak** eta **odontoblastoak**, **kondrozitoak**, **mastozitoak** (globulu zuri bereziak), **adipozitoak**, eta baita zelula endotelialak (odol hodietan).

Batez ere, **muskulu leuna** eta **zelula endotelialak**.

#### 1.4 Sailkapena

- Ehun konektibo enbrionarioa: mesenkimatikoa eta gelatinotsua. Oso garrantzitsua gazteetan, eta helduetan oso urria. Nahiz eta arrasto batzuk mantendu, gehiena enbrio fasearen ondoren desagertu.

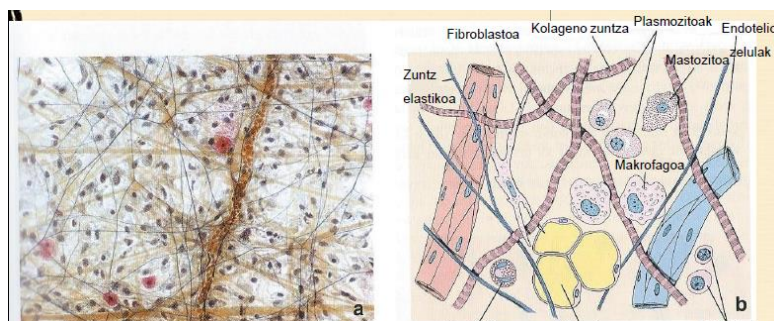
- Ehun konektibo erretikularra: zenbait organo inguratzen du, soilik helduetan agertzen da, eta kantitate txikian
- Ehun konektibo adipotsua: zuria eta arrea.
- Ehun konektibo zuntzekatua: ugariena da, eta bi taldetan banatzen da: laxoa (laminarra, pigmentatua, zelularra eta erretiformea) eta dentsoa (modelatua eta ez-modelatua).
  - Ehun konektibo **modelatua**: Kartilagoa (hialinoa, elastikoa eta fibrokartilagoa), hezurra eta dentina. Euskarri fisikoa eta matrize estrazelular berezia dute (klatzifikatua).

## 2. Matrize estrazelularra:

### ❖ Osagaiak:

- Oinarrizko substantzia: oso homogeneoa.

- Proteoglikanoak (sulfatatuak, ez sulfatatuak)
- Glikoproteinak (fibronektina, laminina)
- Ura
- Ioiak
- Elikagaiak
- Hondakinak

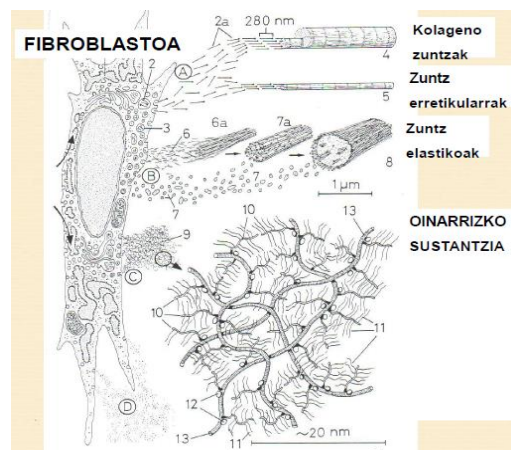


- Zuntzak: kolageno zuntzak, erretikularrak eta zuntz elastikoak

### ❖ Ehunen arabera osagai desberdinen proportzioa (zelula/matrize) eta ezaugarriak aldakorrak dira.

### ❖ Organismoko zelularik ugariena **fibroblastoak** dira. Matrizeko oinarrizko substantziak jariatzen dituzte (hemengo **zelula espezializatuak**), eta hauek sintetizatzen dutenaren arabera da: zuntzekatu ugaria, kolageno mota (normalean **I** motakoa)... Matrizea aldatzea eragiten dute.

### ❖ Matrizean, zenbait zelula daude murgilduta; batzuk matrize horretan gelditu, finko daude, baina beste batzuk ordea, migratu egiten dute. Interakzio gehiago dago zelula eta ME-aren artean, zelula-zelula artean baino.



## 3. Ehun konektibo enbrionarioa:

Organismoaren fase enbrionarioan bakarrik agertu, gero ordezkatur.

### 3.1 Mesenkimatikoa

Beste ehun konektiboko barianteen jatorria da, baita beste ehun batzuen (muskulua) jatorria.



*Zelula mesenkimatiko eta pluripotenzialen arteko desberdintasuna:*

- Zelula pluripotenzialak enbrioia morula, gastrula... eta fase horietan sartzen denean dituen zelulak dira; desberdintzatu gabe dauden zelulak dira eta hemendik edozein ehun mota sor daiteke.
- Zelula mesenkimatikoak mesodermoan dauden zelulak dira, eta hauek ere desberdintzatu gabe daude beraz zelula pluripotenzialtzat har ditzakegu, baina hauen desberdintzapena mugatuagoa da; soilik ehun konektiboa eta muskulu ehuna eratu dezakete.

Matrize estrazelular asko, biguna eta fluidoak → Oinarrizko substantzia ugari eta kolageno, zuntz gutxi.

**Zelula mesenkimatikoak:**

Izar itxurakoak eta taldekatuta, saretuta, ager daitezke dituzten **luzakin zitoplasmatiko luzeen** bidez zelulak bata bestarekin lotuz (nexuak). Desberdintzatu gabeko (pluripotenzialak, ehun gehienak sortzeko gaitasuna) eta asko zatitzen diren zelulak dira. Hauetatik hainbat zelula sortzen dira.

Helduaroan mesenkimatikoko gune batzuk, **zelula amak**, mantendu, ordezko populazio moduan jokatuz, organismoan ehunen bat sortzea beharrezkoa bada.

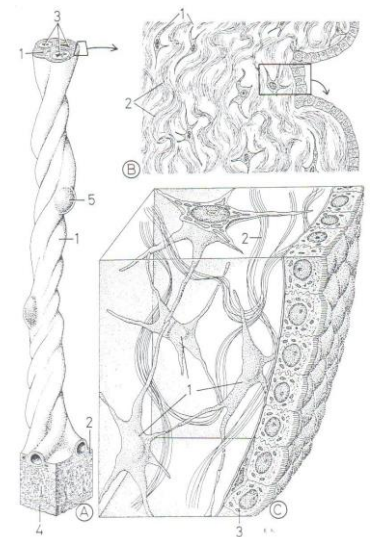
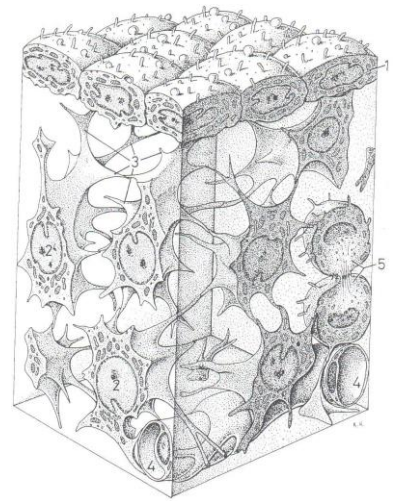
Hiru dimentsioko sarea osatzen dute, tartean odol kapilareak kokatzen direlarik.

### 3.2 Ehun konektibo gelatinotsua (Wharton-en gelatina)

**Zilbor-hestean** soilik (organismoan desagertu jaiotzean).

Matrize estrazelularra: Oso hidratatua den oinarrizko substantzia ugari. Kolageno zuntz gutxi, nahiz eta mesenkimatikoan baino gehiago izan.

Zelulak: mesenkimatikoaren antzekoak baina gutxiago.



## 4. Ehun konektibo erretikularra

Oso gutxi dago organismo bakoitzeko eta oso gune espezifikoetan agertzen da, eta ehun konektibo laxoaren barruan sartu daiteke. **Hezur-muinaren, barearen eta nodulu linfatikoen** kanpo euskarria.

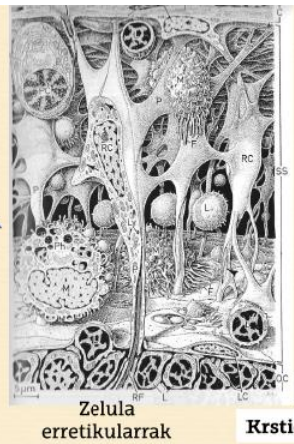
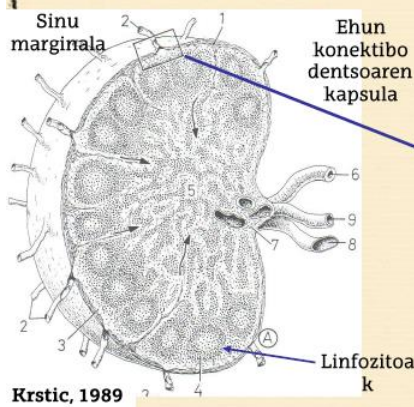
Guruin-lobuluak isolatzen ditu eta odol eta linfa kapilareekin asoziatzen da.

Zuntz erretikularrak kolageno zuntzak dira, eta modu berezi batean antolatzen dira, sare konplexu bat sortuz, **euskarri funtzioa**.

Zelula erretikularrak, mesenkimatikoaren oso antzeko fibroblastoak. Nahiko aberatsa da zeluletan, zelula handiak, luzakin zitoplasmatiko ugariarekin. Izar itxura.



## NODULU LINFATIKOIA



**Nodulu linfatikoa:**  
linfozitoz beteta. Ez daude ehun konektibozko kapsula batek estalita.

## 5. Ehun konektibo adipotsua:

**Adipozitoak** zelula mesenkimatikoetan dute jatorria eta ehun adipotsuko zelula mota nagusiak dira. Oso aldakorak tamainari dagokionez. Xafla basala dute, eta zenbaitek, ehun konektibo erretikularren gaineztadura (organismoaren zati batzuetan bakarrik, zahartzean). Gaineztadura horri esker, energia behar estra bat dagoenean, edo erdiko zelula adipotsu horien falta dagoenean, ehun konektibo erretikularreko zelulak garatzen hasten dira, eta lehen aurreko adipozitoek okupatzen zuten tokira pasatzen dira.

Adipozitoek, lipidoen sintesia eta metaketa burutzen dute. Zitoplasma aberatsa lipido tantetan, mitokondrioetan eta Golgi Aparatuan aberatsa da, erlatiboki (lipido tanta ez den guztia bete, baina zelulari begiratzuz gero kopurua ez da hainbesteko).

\* **Smad 3,4** (transmizio faktorea). Zelula mesenkimatiko batzuek kinada hau pairatu. Aktibatu eta adipozitoa, adipoblasto bihurtu eta desberdintzatzea eragin. Mesenkimatikoak zatitzeari utzi eta desberdintzatzen hasi. Gene batzuk aktibatu eta beste batzuk isilarazi.

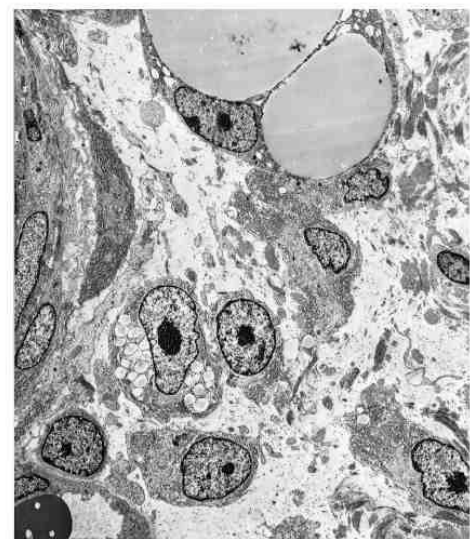


Fig. 6-5. Fotomicrografía de adipocitos en diversas etapas de maduración en la hipodermis de rata. Obsérvese el adipocito en la parte superior de la imagen con su núcleo y citoplasma presionados hacia la periferia por la gota de grasa. (Tomado de Hausman GJ, Campion DR, Richardson RL, and Martin RJ: Adipocyte development in the rat hypodermis. Am J Anat 161:85-100, 1981. Copyright © 1981. Reimpreso con autorización de Wiley-Liss, Inc, una subsidiaria de John Wiley & Sons, Inc.)

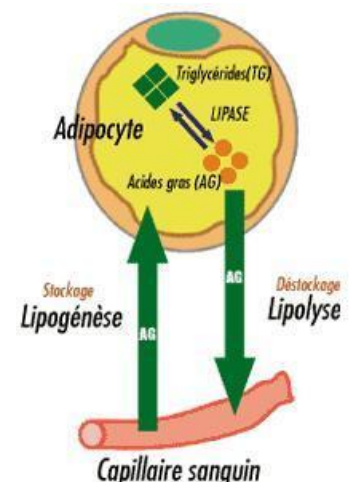
Copyright © 2002 by W.B. Saunders Company. All rights reserved.

### 5.1 Kokapena:

- Banaka, modu isolatuan
- Taldekatuta
- Beste ehunen barruan talde txikiak osatuz

### 5.2 Funtzioak

- Erreserba materiala metatzea, triazilglizerido bezala, lipido tantetan. Normalean zelula metabolikoki ez oso aktiboak dira. Triazilglizeridoak gantz azido bihurtu lipasa entzimaren bidez. **Lipolisi** bidez odol kapilareetara garraiatu. Odol kapilareetatik adipozitoetara **lipogenesi** bidez. Odoletik, itu zelulara, ehun



periferikoetara, joango dira gantzak eta hemen erreserba material bihurtu eta beren funtzioa beteko dute.

- Gorputzaren azalera modelatzen du
- Babes mekanikoa: Amortiguazio bezala (nerbioen inguruan kokatzen dira hauek babesteko).
- Betetze funtzioa: garatuta ez dauden organoentzako lekua bete. Garapenean zehar zenbait organok azalera handiagoa hartzen dute. Zelulak zatitzean zelula berriek inguruko adipozitoetatik energia hartzen dute, eta hauen tokia zelula espezializatuek ordezkaturiko dute.
- Babes termikoa: gorputza bero mantentzen du

### 5.3 Motak: Biek jatorri bera

- ❖ Zuria edo unibakuolarra: ugariena. Batez ere funtzioak betetzen dituena. Zelulak nahiko handiak dira eta azalera gehiena lipido tanta batek betetzen du, nukleoa periferikoa izanik.

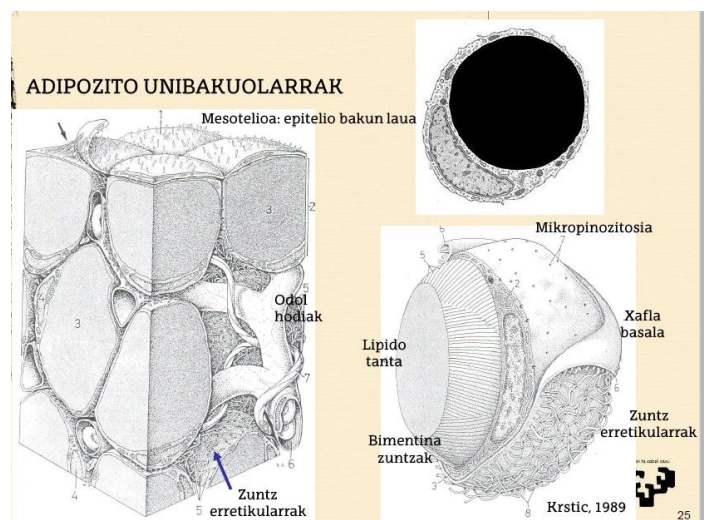
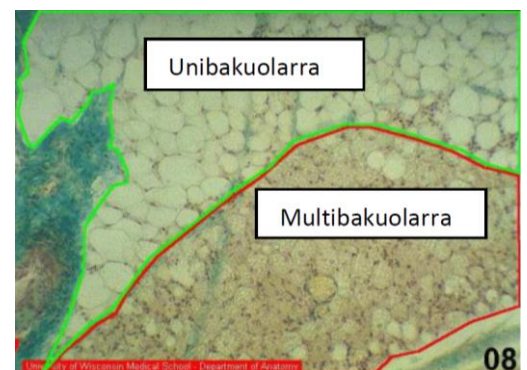
**Adipozito unibakuolarrak** oso zelula handiak dira (100µm), eta hauen inguruan zuntz erretikularren geruza bat dago, helduak direnean kopurua handia da, eta gaztetan geruza bakar batez inguratuta daude.

Lipido tanta bakarra dute, edo gehienez bi, eta horren inguruan bimentinazko piruak agertzen dira, sare bat eratuz, zitoplasma eta nukleoa periferiarantz bultzatzen dutelarik. Lipido tanta hau, beraz, ez dago mintz batez inguratuta eta zelula metabolikoki aktiboak dira. Gantz azidoak eta triazilglizeroak metatzeaz gain, hormonak (intsulina, glukokortikoidak) metatu ditzakete, hauen hartzailak mintzean eta gero hauen kanporaketa eraundu dezakete.

Heltzen direnean ez dira zatitzen, soilik tamaina handitzen (proliferazio mugatua) edo txikitzen dute. Preadipozito fasean zatitu daitezke, baina desberdintzapena amaitzen denean ezinezkoa da zatiketa gertatzea, helduak direnean ezin dute mitosirik egin.

Tamainaren handipena normala bada, hau da, prozesu motel baten bitartez, adipozito osasuntsuak odoleztatuta egongo dira; baina gehiegi handitzen badira oxigeno arazoak sortuko dituzte. Gehiegizko dieta baten ondorioz, azkarregi handitzen badira, gerta liteke **angiogenesis** sortzea, hau da, odol hodiak garatzea ekidituko dute, eta metabolikoki adipozitoak ez aktibo bihurtuko dira, zelula hilak sortuz. Hildako zelula hauek gantzez beteak daude eta oxigeno fluxurik gabe, ondorioz lipidoen liseriketa egiteko arazo handiak sortzen dira.

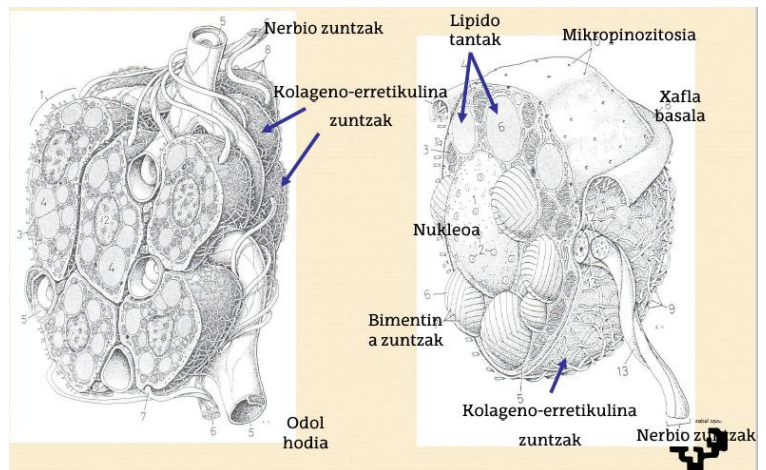
Osasuntsuetan tamaina antzekoa dute denek, baina osasuntsuak ez direnean irregularrak eta batzuk normalean baino askoz handiagoak izango dira.





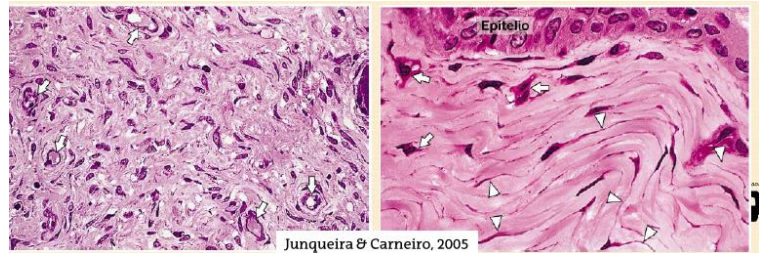
- Motak:
  - Egiturazkoa: organoak inguratu
  - Metaketazkoa: Kaloria metaketa, isolamendu termikoa (heste lodian hemengo mugimendua babesteko)

- ❖ Arrea edo multibakuolarra: Adipozito multibakuolarrak txikiagoak dira unibakuolarrek baino, baina, hala ere, tamaina handia daukate. Hemen tamaina desberdinetako lipido tanta bat baino gehiago metatzen dituzte eta nukleoa zentrala da. Mitokondrioek gangar borobilak dituzte. Besteak beste, barne mintz horretan **termogenina** proteina dago, elektroigarraioa fosforilazio oxidatibotik desgardeinaturik dago, eta honen bidez, beroa ekoizten da. Beraz, adipozito hauetan ez da erreserba materialik metatzen ezta ez ditu bestelako funtzioak betetzen, soilik beroa ekoizteko funtzioa daukate, zein gaztetan oso garrantzitsua den. Oso odolzetatuta dago. Bimentinazko piruak agertzen dira bitartean. Oso ugaria da jaioberri eta animalia heldu hibernanteetan.



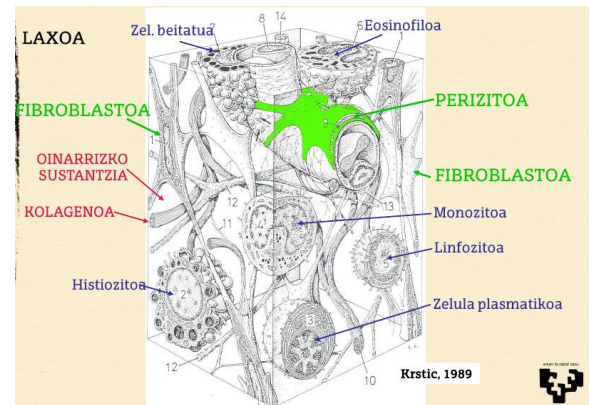
## 6. Ehun konektibo zuntzekatua

Oinarritzko ehun konektiboa da, garrantzitsuena betetzen duen azaleragatik. Ehun konektibo mesenkimatikoarekin antzekotasun handia du. Zelula gutxi eta matrize asko dago. Bi ehun konektibo zuntzekatu daude, laxoa (baldin eta matrizean oinarritzko substantzia asko eta zuntz gutxi daude) eta dentsoa (zuntzak ugariak direnean eta oinarritzko substantzia urria).

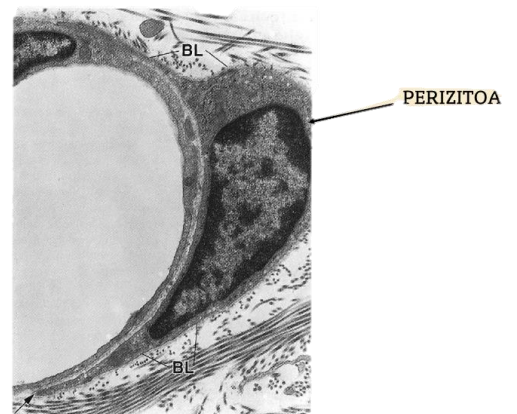


### ❖ Laxoa edo aerolarra:

- Ehun bigun, malgua eta elastikoa
- Oso hedatua: epidermisaren azpian, epitelioetan, muskulu/nerbioen artean, organoen estroman.
- Oinarritzko substantzia asko
- Oso ohikoa odol hodiak ikustea
- Zeluletan nahiko aberatsa: migratzaileak (globulu zuriak, linfozitoak, leukozitoak adibidez) eta finkoak (perizitoak\* eta fibroblastoak\*, hauek eratu ME, edo fibrozitoak)

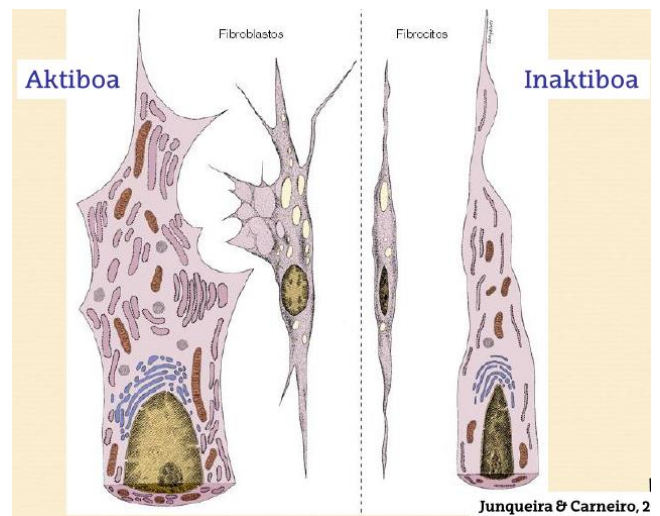


**\*Perizitoak:** zelula endotelialen gainean kokatuta. Odol kapilareekin substantzien trukean parte hartzen dute eta hauen diametroa kontrolatzen dute. Kapilareetatik alde egin dezakete eta ehunetara migratu. Zelula zuntzekatuen zelula amak dira. Desberdintzatu eta ehun konektibo zuntzekatua eratzekeo fibroblastoak sortu.



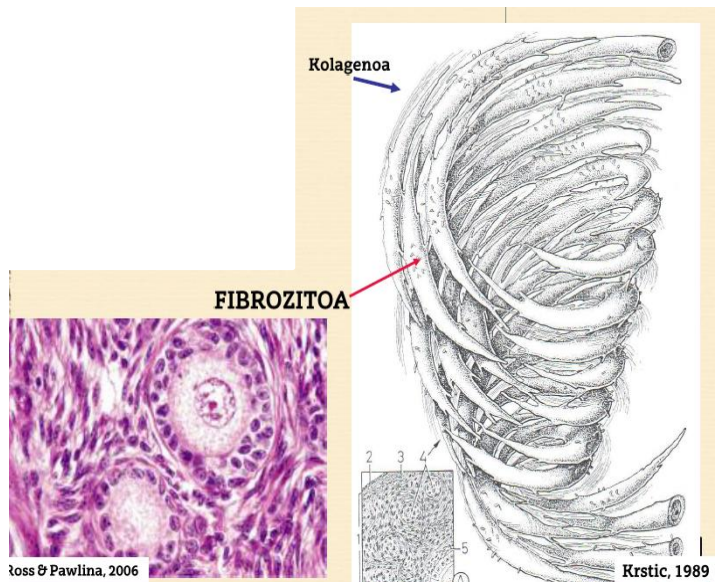
**\*Fibroblastoak:** Ehun konektibo zuntzekatuko zelula nagusiak, ME sintetizatzen dute. Nukleo obalatuak eta hainbatetan bi nukleolo edo nukleo bat baino gehiagorekin. Zelula luzeak luzakin zitoplasmatikoekin. Dentsoan zein laxoan agertu. Oso erraz pasatu egoera aktibotik inaktibora.

- Aktiboak: Soslai fusiformea/luxezka. EEP eta GA oso garatuak, ME sintetizatu eta jariatzen dute. Honen osagai den prokolagenoa eta bestelako konposatuen sintesian oso eraginkorrak. Funtzio nagusia kolagenoa sintetizatu eta jariatzea.
- Inaktiboak (fibrozitoak): aktibatu egin daitezke kinada sinpleekin eta funtzioak aldatu. Txikiagoak eta EEP gutxiago, ez dute behar. Zelula oso lauak, luzakin zitoplasmatikoekin. Ez dute inolako sintesi prozesurik burutzen. Kitzikapen egokiarekin egoera aktibora pasatu.



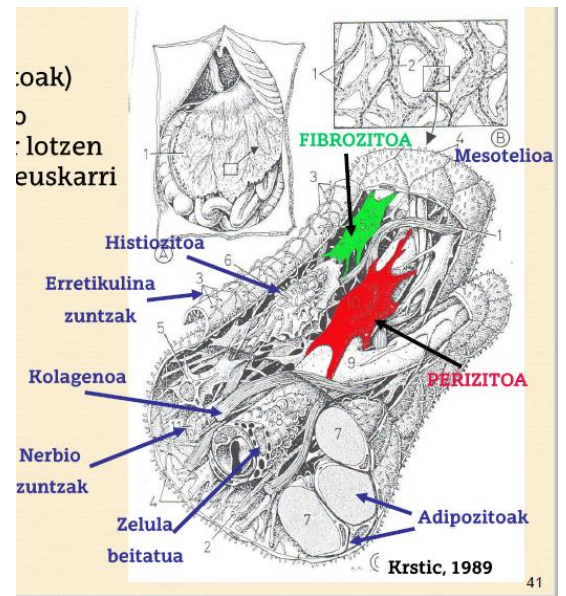
### Laxo motak:

- Ehun konektibo zelularra: Modu berezian antolatzen den ehun konektibo laxoa da eta izen berezia hartzen du. Obarioetan bakarrik agertzen da, hau inguratuz, zurrumbilo itxuran antolaturiko fibrozitoz osatuta (zurruntasuna eman obarioari). Zuntz gutxi dago eta zelula asko, folikulu primario (obarioen zitoplasma + geruza bat) eta primordialak inguratuz.





- Ehun konektibo erretiformea: omentoetan [peritoneoko: ornodunen barrunbe abdominala eta barrunbe honetako zenbait organo estaltzen dituen mintz serosoko tolesdurak dira, **erraiak** (gorputzaren barrualde eta sabelaldeko barne-organok) elkarrekin lotzen dituzte eta odol hodien euskarri dira] agertzen da, oso odoleztaturik agertzen da, zelula nahiko ditu eta zuntz gutxi, kolagenozkoak direnak.

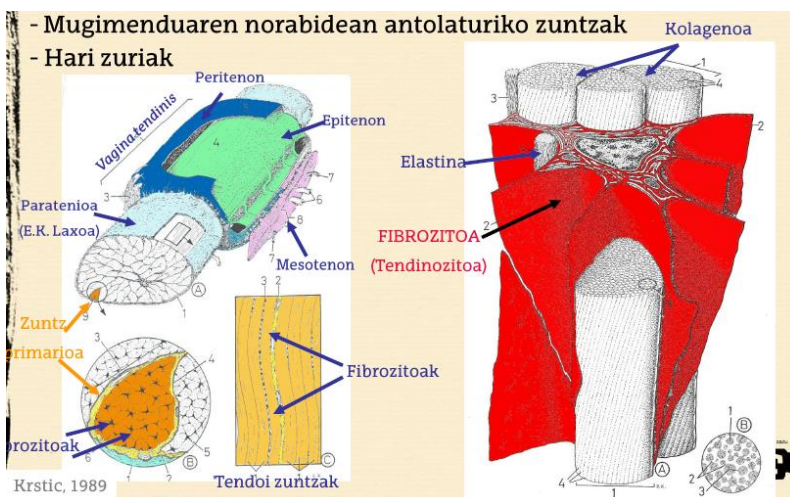
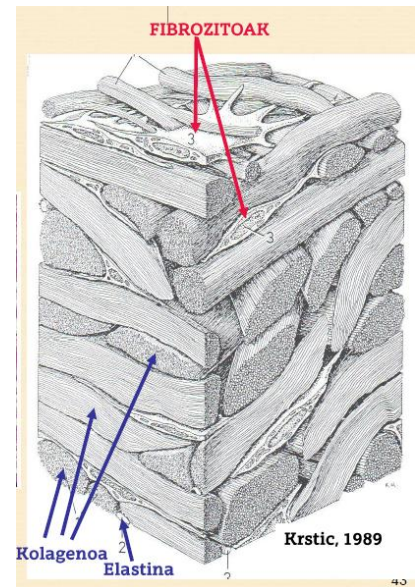


#### ❖ Dentsoa:

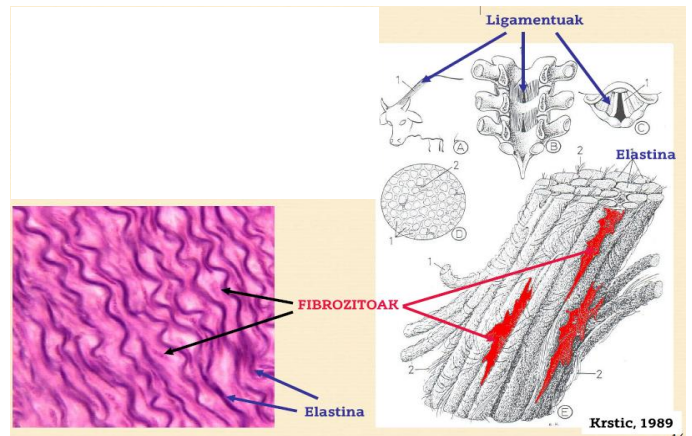
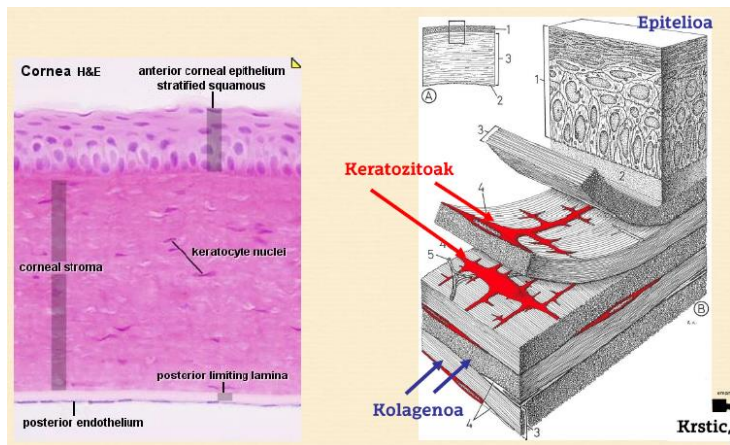
- Kolageno zuntzak zelulak eta oinarritzko substantziak baino aberatsagoak dira.
- Ehun helduetan, fibroblastok ez dira oso aktiboak, euste funtzioa betetzen dute
- Zelula migratzaileak oso urriak dira, makrofago gutxi batzuk baino ez, zerbait kaltetua denean soilik agertzen direnak, zuntz askok ekiditen dutelako mugimendu hori.

**Dentso motak:** Kolageno zuntzen antolamenduaren arabera modelaturik edo ez modelaturik izan daitezke ehuna.

- Ez modelaturik: Zuntz bakoitzak norabide desberdina dauka, ez dago ordenamendu bat kolagenozko zuntzetan. Oso egitura egonkor eta mekanikoki indartsua da. Fibroitoa eta oinarritzko substantzia gutxi. Metabolikoki geldia da eta oso odol hodi eta nerbio zuntz gutxi agertzen dira. Ugaztunen dermisean (larruazaren azpian) eta organoen gaineztaduran oso garrantzitsua da, erresistentzia mekanikoa emanez. Odol hodi gutxi.
- Modelaturik: Zuntzak paraleloki edo perpendikularki antolatuta daude, ordenatuak, norabide zehatz batekin. Zelula inaktiboak daude, oinarritzko substantzia gutxi eta zuntz oso ageriak dituztenak. Mugimenduen norabidean antolatutako zuntzak.



Tendoi kasuan kolageno zuntz guztiak paraleloki antolatuta daude, hari zuriak.



Kornearen estroman eta abdominaletan, tendoi lauak, azau elkargurutzatuak = aponeurosia. Keratozitoek GAG eta keratosulfatoak jariatu.

Ligamentu elastikoa, norabide berean antolaturiko elastina zuntzak: behien lepoalde, bizkarrezurra, ahots kordak.

## 7. Zelula migratzaileak eta odola

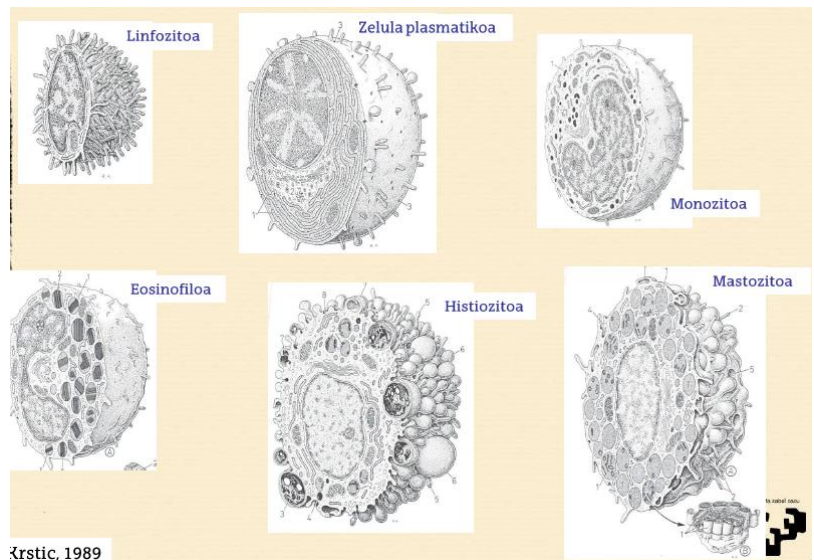
Odola fluido bat da, zelula ezberdinez osatua dagoena, eta ehun konektibo bezala sailkatzen da. Ez du zurruntasuna emateko zuntzik eta jatorri mesodermikoa du. Odol hodietatik zirkulatzen du, endotelioa ondoan duela. Bi osagai: plasma izeneko matrize estrazelularra eta zelulak, oso desberdinak. Honen berezitasun nagusia likidoa izatea da.

### 7.1 Funtzioak:

- Ehun guztien arteko komunikazioa eta euskarri logistikoa baimendu: hormonon bidezko garraiorako odola erabiltzen da
- Oxigenoa garraiatu (birikietatik ehunetara)
- Elikagaiak garraiatu (hesteetatik ehunetara)
- Hondakinak garraiatu: iraizketa
- Organoen funtzioak integratu: seinalizazio hormonal
- Babesa: immune sistemako zelulak garraiatu, egitura arrotzei aurre eginez.

### 7.2 Osagaiak:

- Plasma: osagai fluidoak (odolaren %55a)
  - Ura (%90)
  - Proteinak (seroalbumina, koagulazio faktoreak, antigorputzak, lipoproteinak...)
  - Beste batzuk (glukosa, aminoazidoak, gantzak, urea...)
- Zelulak:
  - Globulu gorriak: eritrozitoak, gehienak
  - Globulu zuriak: leukozitoak, mota eta jatorri ezberdinekoak
  - Plaketak: ez dira benetako zelulak, osagai zelularrak dituzte



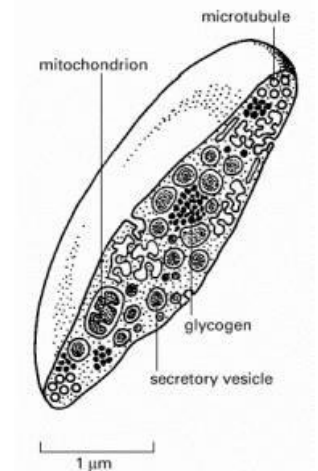


1) Globulu gorriak:

- Ez daukate nukleorik, hau da, desberdintzapen prozesuan zehar nukleoa galtzen du, eta beraz, nukleo gabeko egitura bihurtzen da
- Hemoglobina pigmentua daukate: odolari kolore gorria ematen dio Fe duelako, O<sub>2</sub>rekin lotzean
- O<sub>2</sub> eta CO<sub>2</sub> garraiatzen dituzte
- Eritrozito/hemoglobina gutxi badituzu, anemia
- Mintzeko glukoproteina integralak (antigenoak) ABO odol sailkapenaren oinarri dira
- Nukleorik ez dutenez ezin dira zatitu, muinean zelula amak daude hildakoak ordezkatzeko
- Zelula hauen mintz egitura oso berezia da, gasekiko iragazkorra

2) Plaketak:

- Odoletako osagai zelular txikienak dira
- Oboideak/fusiformeak koloregabeak eta nukleogabeak dira.
- Koagulazioan hartzen dute parte: Endotelioan zauriren bat badago zauriak itxi
- Hazkuntza faktore berezi bat daukate (PDGF) odol hodien berrizketan eta luzaketan laguntzen dute.
- Zelula hauen jatorria megakariozitoan dago. Hau zelula oso handia da, eta bere desberdintzapenean, momenturen batean apurtu egiten da zati askotan, eta zati horiei plaketa deritze. Plaketak, berez ez dira zelulak.



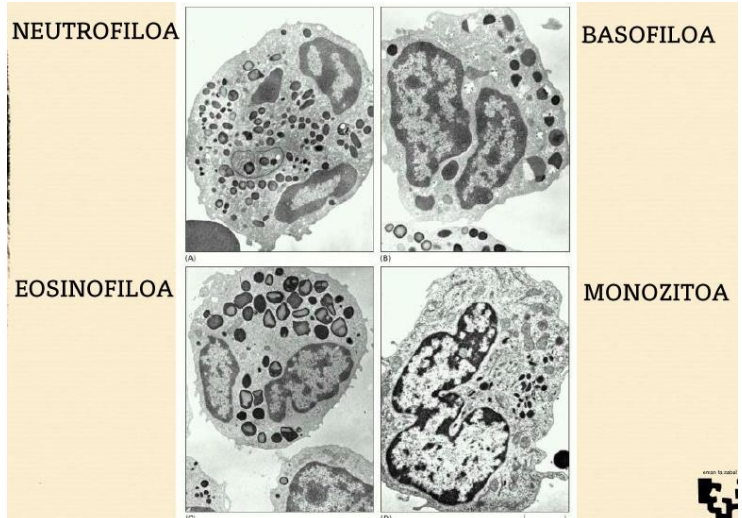
3) Leukozitoak:

- Eritrozitoak baino urriagoak dira kantitatean baina mota asko daude.
- Funtzio nagusia sistema immunearen parte izatea da, patogenoen aurka eginez, eta nagusiki bi talde handitan bereizten dira: pikortsuak eta ez pikortsuak.

3.1) **Pikortsuak:** neutrofilo, basofilo eta eosinofiloak dira. Pikorren pHaren arabera sailaktu. Neutroa bada neutrofiloak dira, bakterioak fagozitatuz eta suntsitzen dituzte (beste biek ere baina neutrofiloek gehiago). Basofiloek histamina jariatzen dute (ehun konektiboan mastozitoak).

Eosinofiloek parasitoen aurka egiten dute eta prozesu alergikoetan parte hartzen dute. Nukleo oso irregularrak dituzte, eta mozketaren arabera nukleo bat baino gehiago agertu daiteke.

3.2) **Ez pikortsuak:** Monozitoak zelula nahiko handiak dira eta garapenean zehar makrofago bihurtuko dira, patogenoak fagozitatuz. Pikortsuk baino handiagoak dira eta nukleoak indaba forma hartzen du.





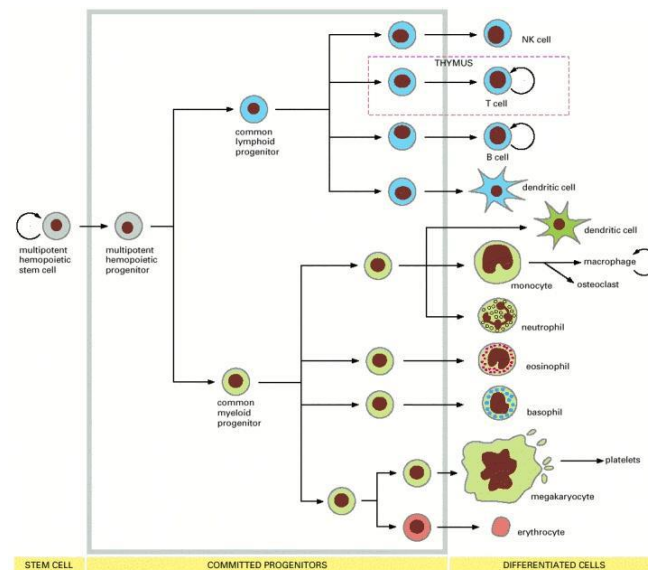
Linfozitoak zelula txikiak dira, hainbat aldaketa euren DNAn. Oso nukleo handia eta erregularra. B (antigorputza ekoiztu), T (birusek infektatuak hil eta beste linfozitoen aktibitatea eraendu) eta NK (zelulak hil mekanismo zitotoxikoen bidez, apoptosira bultzatu)

Odolean horretaz gain makrofago eta megakariozitoak daude. Makrofagoak oso baldintza berezietan ikusi daitezke, eta megakariozitoak oso urriak dira.

## Hematopoiesia

Odol zelula berrien sorrerari **hematopoiesia** deitzen zaio. Zelula hauen etengabeko berriztapena beharrezkoa da, etengabe funtzionatzen daudenez, biziraupen laburra baitute. Zelula berrien ekoizpen hori hezur muinean ematen da; bertan ama zelula berezi bat (hematopoietikoa, HSC) dago, eta hau etengabe zatitzen da. Sortzen diren zelula berri batzuk ama zelulak izango dira, eta beste batzuek, berriz, odoleko zelula mota desberdinak emango dituzte. Enbrioi goiztiarrean, zatiketa hori bitelo-zakuan gertatzen da. Feto garaian, berriz, gibelean. Hematopoiesirako SCF (“stem cell factor”) izeneko hazkuntza faktorea ezinbestekoa da.

Zelula ama { Linfoideak → garatu eta espezializatzean; NK, T eta B linfozitoak emango dituzte  
Mieloideak → monozitoak, neutrofiloak, eosinofiloak, basofiloak, plaketak eta eritrozitoak emango dituzte



## 7. Ehun konektibo figuratua

- Ehun konektibo berezia, espezializatua
- Funtzioa: gainerako ehunen sostengua
- Zelula mesenkimatikoetatik eratorria → jatorri mesodermikoa
- ME berezia eta garrantzitsua, askotan kaltzifikatuta (oso gogorra)
- Organismoari euskarria eman
- Bestelako ehunak, ehun bigunagoak, bere gainean kokatu
- Motak: kartilagoa, hezurak eta dentina.

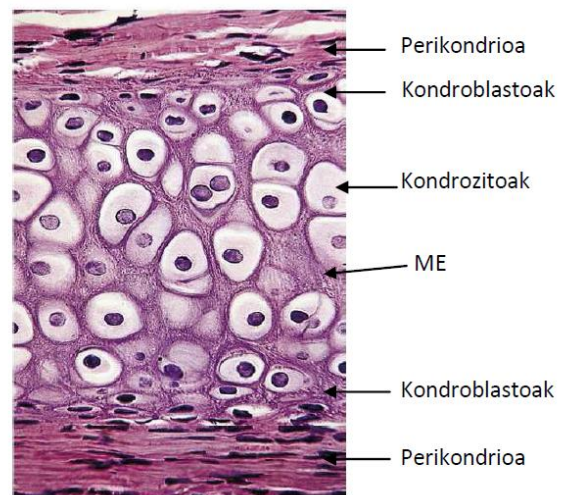
### 1. Kartilagoa

Ehun konektibo figuratua, hezurre bezala.

Organismoari euspen eskeletikoa eskaintzen dio, batez ere, garapenaren hasierako faseetan (ehun bigunen euskarria), eta heltzen goazen heinean hezurraz ordezkatzeko da.

Osagaiak:

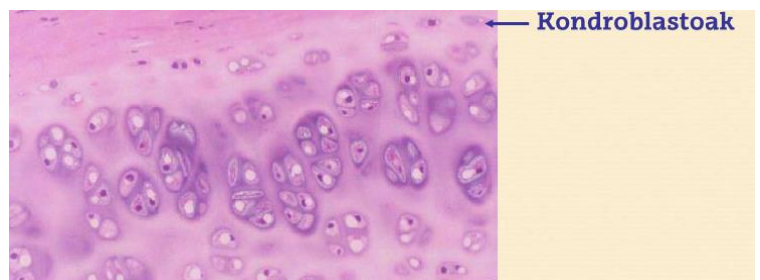
- Zelulak: kondrozitoak, kondroblastak
- Zuntzak: elastikoak, kolagenoak
- Oinarritzko substantzia: biskositate altukoa, gogorra eta kaltzifikatua
- ME: osagai nagusia. Zuntzak eta oinarritzko substantzia. Erdi zurrina, flexiblea eta erresistentea.
- Ez du odolzetapenik, ez dago odol hodirik eta elikagaiak difusioz heldu
- Ez dago inerbatuta, ez dago nerbio edo nerbio bukaerarik, kartilagoa egitura **homogeneoa** da eta ez zaio bulkadarik iristen, ez du mugitzeko ahalmenik
- Perikondrio\* (dentsoa) izeneko geruza batez **inguraturik**. Kartilagoa perikondriotik desberdintzatuz sortzen da.



\*Perikondrioa: Bi geruza edo alde osatuta dago. Batetik, barne geruza. Hemen kartilagoko zelula gazteak agertzen dira, kondroblastak deritzenak. Zelula hauen jatorria zelula mesenkimatikoetan dago eta horietatik batzuk kondroblastak bezala desberdintzatuko dira. Hauek bata bestaren ondoan kokatuz xafra bat sortzen dute. Bestetik, kanpoaldera begira ehun konektibo zuntzekatu dentso ez modelatua.

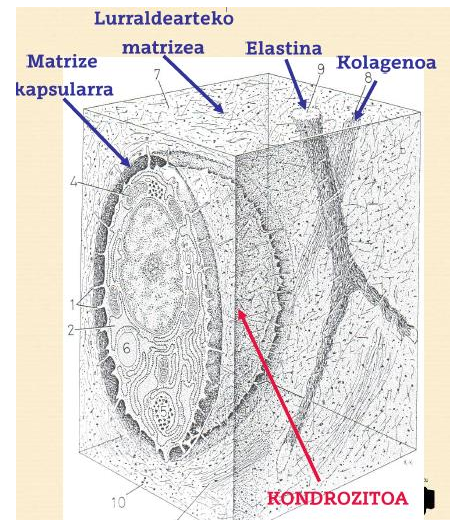
#### **Zelulak:**

- ❖ Kondroblastak: Desberdintzatutako gabeko zelula aitzindariak. Perikondrio azpian kokatzen dira. EEP eta GA garatuak dituzte, MEko osagaiak sintetizatu eta jariatzeko. Honez gain, zatitzeko ahalmena dute, kondroblastak gehiago sortzeko.



Ahalmena galtzean migratzen hasten dira, matrizean murgilduta geldituko dira eta **kondrozito** bihurtu. Beraz, kondroblastoak kartilagoaren zelula gazteak dira eta kondrozitoak zelula zaharrak.

- ❖ **Kondrozitoak:** Kartilagoaren bestelako osagaiak sintetizatzen dituzte, eta beraz, hauek ere EEP, GA eta zitosi besikula ugari dituzte, baita mitokondria, glukogeno eta lipido tantak (erreserba materialak) ere. Mintzaren gainetik, mikrobiloskak bereizten zaizkie. ME-ean aurkitzen diren aintzira edo laku izeneko barrunguneetan kokatzen dira. Aintzira bakoitzean kondrozito bana kokatzen da eta zatiketa mitotiko bat edo biz hainbat zelula berri sortzen dira **talde isogeniko** izeneko taldekapenak (bi edo lau zelulakoak) eratuz. Hau sortzean, ez dira gehiago zatituko, kartilagoko zelula heldu bihurtuz. Dena dela, talde hauek eratu arren, ez dago zelularteko loturarik; ez kondrozitoen artean, ez eta talde isogenikoak eratzen dituztenen artean.

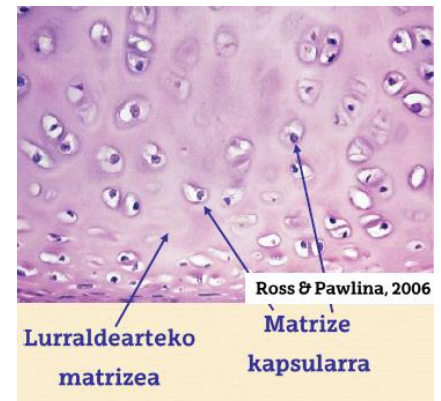


Kondrozitoen inguruan dagoen **ME**-a bi ataletan banatu daiteke (kondroblastoek ez):

- **Matrize territoriala edo kapsularra:** aintziretatik gertuen dagoena, eta kondroitin sulfatoan aberatsa.
- **Lurraldearteko matrizea:** gainerako guztia, oso homogeneoa. Kondrozitoen arteko guneak okupatu.

#### Matrize estrazelularra:

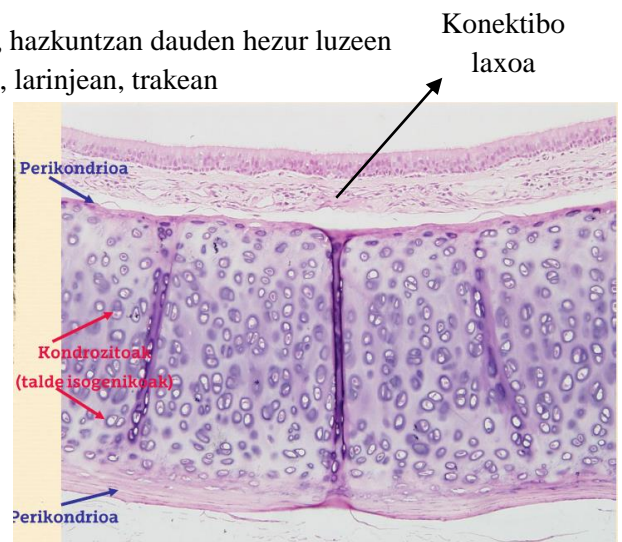
- Zuntzak: kolageno I eta II eta elastikoak
- Oinarrizko substantzia: euskarria ematen duen osagai nagusia
  - GAG sulfatua: keratan sulfatua, kondroitin sulfatoa
  - Azido hialuronikoa eta beste substantzia batzuk
- Funtzioa: estres mekanikoa jasateko beharrezko malgutasuna eskaintzea deformazio nabarmenik gabe



#### Kartilago motak: MEko zuntzen konposaketaren arabera desberdindu

- 1) Hialinoa: ugariena, hezurren artikulazio eskualdeetan, hazkuntzan dauden hezur luzeen xafla epifisiarioan (ez dute peridondriorik), sudurrean, larinjea, trakean

- Orientazio nabaririk gabeko II motako kolageno zuntzak (10-20 nm diametroz). Kondroitin sulfato ugari. Glikoproteinak eta proteoglikanoak ere.
- Kondrozitoak: aintziratan bananduak (oso adierazgarriak)
- Oso hidratatua: metabolito txikien difusio eta elastikotasuna ahalbidetzeko
- Matrizea urteek aurrera egin ahala kaltzifikatu, zelulak gutxituz eta ME gehituz

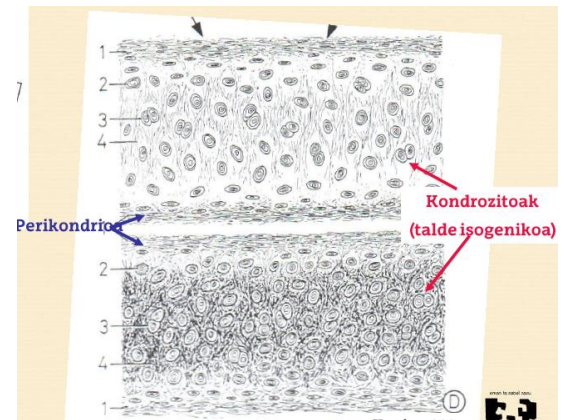


\*Trakearen irudi tipikoa. Goitik behera: epitelio pseudogeruzatua, zilio eta mikrobiloskaduna; ehun konektibo laxoa (odol hodiak daude); ...



## 2) Elastikoa:

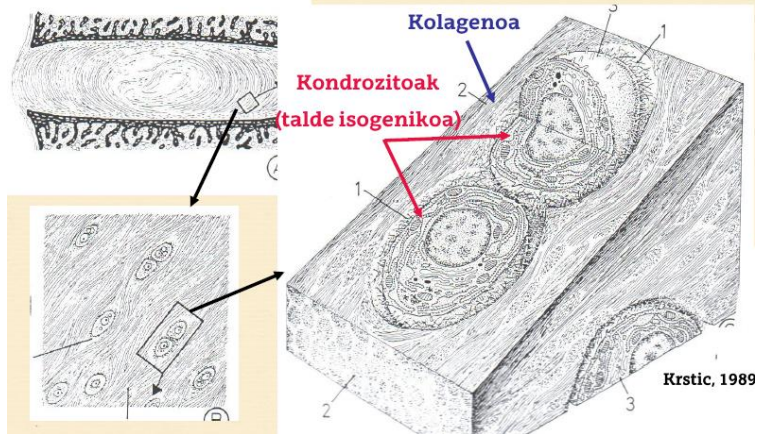
- Oso moldagarria eta malgua, belarrietan eta epiglotisean
- Kondrozitoak: hialinoan baino ugariagoak garapeneko edozein fasetan
- II. Motako kolagenoa eta aintziren inguruan kokatzen diren zuntz elastiko ugari
- Ez da kaltzifikatzen
- Ez da birsortzen (berritze-tasa oso baxua), ez osifikatzen, hezurragatik ordeztzen (hialinoa bai)
- Talde isogenikoak ez dira ondo ikusten eta ez da zurra bi ME dituen



## 3) Fibrokartilagoa: ornoen artean

- Erresistenetea, oso urria organismoan
- Zuntzetan oso aberatsa eta oinarritzko substantzia gutxi
- Ehun konektibo dentso modelatua eta kartilago hialinoaren arteko konbinaketa
- Perikondriorik gabe
- ME ugaria
- I eta II motako kolageno zuntzen sare dentsoa
- Kondrozitoak, 1 edo 2 aintzira bakoitzean, zuntzak jarraituz oso ordenatuta kokatu, paraleloki. Fibroblastoak ere daude.
- Normalean zelulak binaka antolatzen dira (Hialinoan binaka zein launaka). Tendentzia itxura geometrikoak eratzeko.

### FIBROKARTILAGOA



## 2. Hezurra

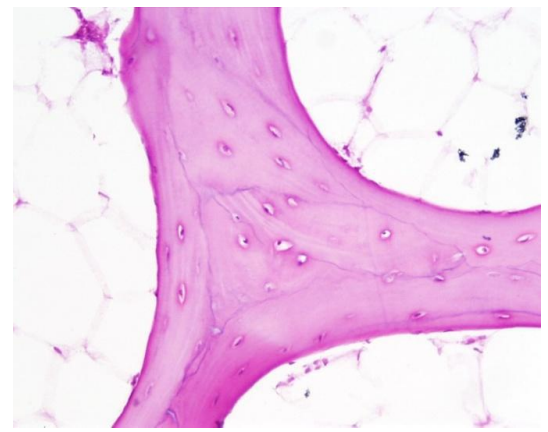
Ehun konektibo figuratua, kartilagoa bezala. Ornodunetan soilik agertzen da, hauen ehun bereizgarria. Osagai estrazelularrak kaltzifikatuta daude, fosfato kaltzikoarekin ( $\text{Ca}^{++}$  eta fosfatoak elkarrekin prezipitatu eta egitura gogorra sortu), hezurra material gogor batean bihurtuz. Egokia euskarri eta babes funtzioa betetzeko (burmuina babesteko hezurrezko estalki gogorra).

Kartilagoaren jatorri bera du, zelula mesenkimatikoak. Jarraian desberdintzapen prozesu desberdina jarraituko dute baina kartilago eta hezurreko ehunen artean antzekotasunak daude eraketari dagokionez.

Kartilagoarekin alderatuz:

- Hidroxiapatitoa ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ): material minerala. Ugaria. Honek eman gogortasuna eta babesa. Kartilagoan ere dagoen arren, hemen gehiago.

- Zelulak luzakin zitoplasmatikoen bidez kontaktuan daude
- Odol hodiak daude ME kaltzifikatua zeharkatzen



#### Osagaiak:

- Zelulak: osteoprogenitoreak → zelula mesenkimatiko desberdintzatutak. Osteozitoak, osteoblastoak, osteoklastoak.
- Zuntzak: I motako kolagena
- Oinarrizko substantzia: gluko- eta fosfoproteinak, kondroitin sulfatoa, keratan sulfatoa eta bestelakoak

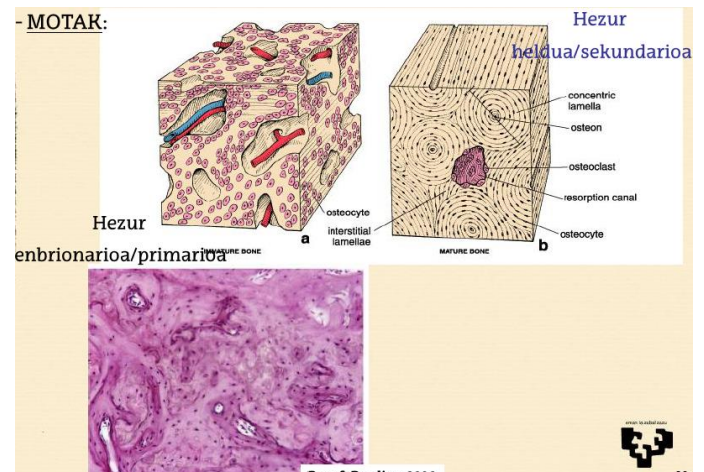
#### Funtzioak:

- Barne euskarria izatea --> muskuluena, tendoiena etb...
- Muskulu eta tendoiaren aingurapena: palanka sistemak baimendu
- Organo bitalen babesa: buruhezurra eta kutxa torazikoa
- Sistema hematopietikoaren kokalekua: odoleko zelulen eraketa, hezur-muinan, gongoil linfatikoan eta barean gertatzen dena.
- Kaltzioa mobilizatu daitekeen metagunea (funtzio sekundarioa): Odoleko kaltzioa erregulatu.  $Ca^{++}$ -k metabolismoa erregulatzeko gaitasun handia du, seinale ioi gisa erabili. Hezurretatik kaltzioa atera daiteke eta garraiatu. Bai kaltzioa eta fosfatoa mugitu egin daitezke matrizean zehar eta odolaren bidez harrapatuak izan daitezke, organismo osoan zehar [ ] egokiak mantentzeko. Gehegizko  $Ca$  dagoenena, hezurretara eraman eta hor inmozilazatuta gelditu.

#### Motak:

##### 1) **Hezur enbrionarioa edo primarioa:** osteoidea

Enbrioien eskeletoan agertzea ohikoa. Kolageno zuntzak ausaz orientatzen dira, zentzu guztietan daude, erresistentzia zelularren maila jaitxi. Osteozito asko, ez dute hezur xaflaskarik sortzen. Behin-behinekoa da, hezur laminarrak ordezkatzeko du.



##### 2) **Hezur heldua edo sekundarioa:**

laminarra.

Hezur helduetan. Kolageno zuntzak antolatutak eta paraleloak eta zelulak ere modu ordenatuan antolatutako dira.

Horregatik egitura askoz ere erresistenteagoa izango da. Osteozito gutxi, ondo antolaturiko hezur xaflaskak sortu. Zelula gutxi, ME asko.

#### Motak:

- Hezur **arola:** Nahiko hauskorra, hezur forma meheak eta adarkatuak. Hezur muina eta sistema hematopietikoa kokatzen direnko barreguneak mugatzen ditu, hezur luzeen barrenean agertzen da. Oso odoleztatua. Esponjosoa. Primarioarekiko antz gehien duen hezur heldua. (Zulo modukoak agertu → arolak).

- Hezur **trinkoa**: itxura zurruna eta gerometrikoa, barrengune gutxi eta txikiak (soilik mikroskopioz bereiztu daitezke).

**Hezur luzeen antolaketa:** Hezurak zilindro huts luze bat dauka, diafisi izenekoa, eta bi erpinetan bi protuberantzia borobilduetan (epifisiak) bukatzen da.

- Diafisia: hormak hezur trinkoaz osaturik daude eta barnealdean hezur muina dago.
- Epifisia: hezur arola dago, hezur trinkoaren geruza fin batez gaineztaturik

Hazten dagoen hezurran, epifisiaren eta diafisiaren arteko ukipen eskualdean (metafisietan), kartilagoa aurkitzen da: xafla epifisiarioa. Hezurra xafla horretatik hazten da.

Hezur luzeetan bi hezur motak aurkitzea ohikoa da. Pareta guztiak hezur trinkoz eratuta. Paretaren erdikaldean edo ertzetan (epifisi guneeetan) hezur arola.

Normalean, hezurak lerro epifisiariorik hazten dira. Lerro hori diafisi eta epifisi arteko gunee batean agertu ohi da.

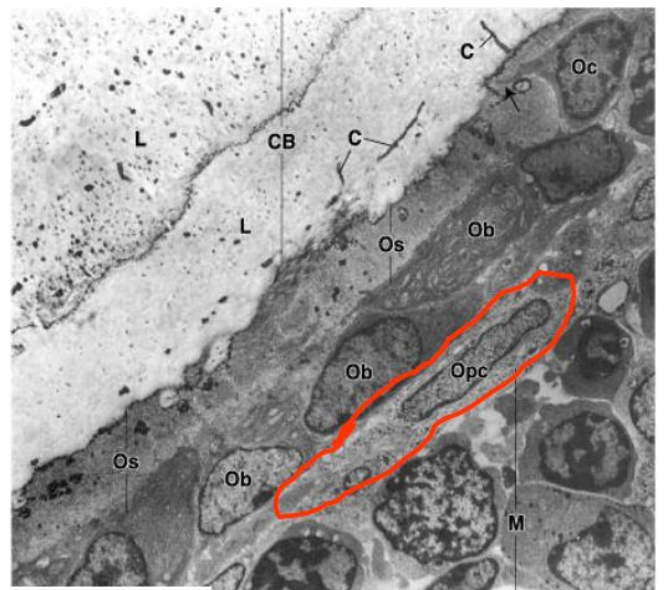
#### Zelulak:

##### 1) **Zelula osteoprogenitoreak:**

Hezurreko bestelako zelulak sortuko dituzten zelula amak. Periostio eta endostiotik eratorriak. Hezuraren ertzetan daude. Oso gutxi desberdintzatuak.

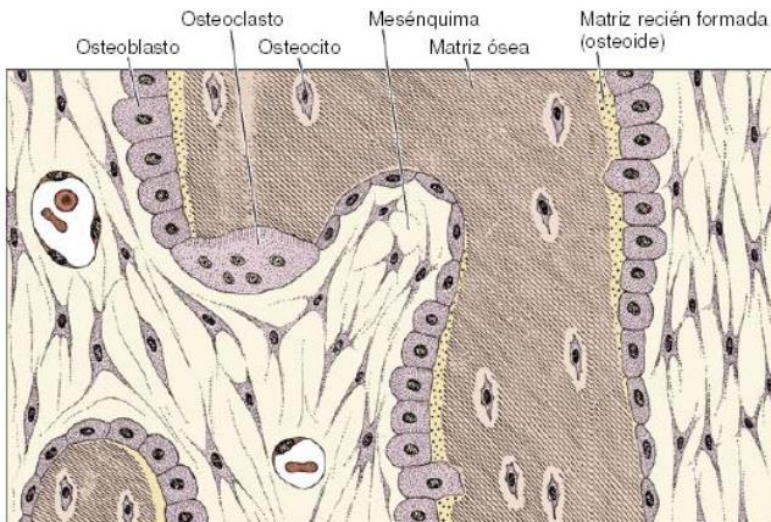
Motak:

- **Zelula mesenkimatikotatik** zuzenean eratorriak: horietatik osteoblastoak (ME sintetizatu, jariatu, murgildu eta osteozito bilakatu) eratuko dira (kartilagoaren gisan). Hezurreko osagai zelular garrantzitsua. Osteoprogenitoreak bi aurkera dituzte, zatitu bera bezalakoak emateko edo osteoblastan zatitzea.
- **Monozitoetatik** eratorriak: osteoklastoak sortuko dituztenak. Monozitoak hasieratik oso desberdintzatuak dauden zelulak dira. Momenturen batean bi monozioto fusionatu eta osteoklastoa sortuko da. Monozitoek aukeratu monozioto gisa jarraitu edo fusionatu.



Behe eskuinetik: hezur muina, gorri zelula osteoprogenitoreak, ezkerrerago osteoblastoak, ezkerrerago osteozitoak..





Zatiketa zelularren ondoren, xafla basalarékin kontaktua galtzen bada zelula osteoprogenitore bihurtzeko aukera asko. (integrinen adierazpen maila jaitsi eta beraz desberdintzapen prozesu batean sartu). OPC zelulak ertzean egon daitezke (sartzen ari direneak ez!!)

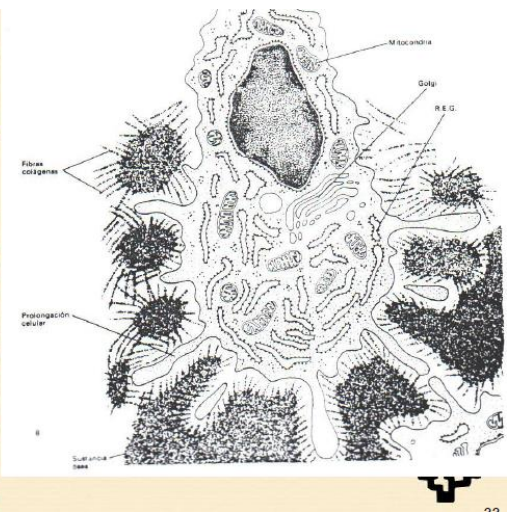
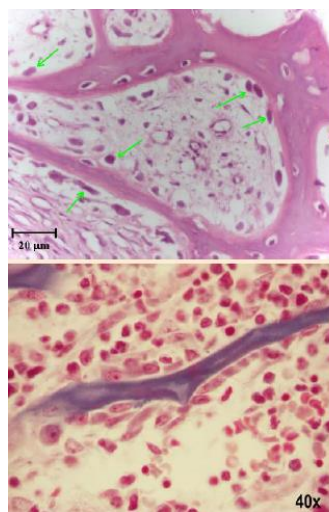
## 2) Osteoblastoak:

(Osteoblastoak oso gutxi zatitzen dira, eta osteozitoak ezer ere ez.)

Hezur berria eratzen ari diren eskualdeetan, sasi-epitelio bat eratzen dute.

EEP eta GAn aberatsak dira, hezuraren matrizeko osagai organikoak sintetizatzen eta jariatzeko. Etengabe matrizea sintetizatu eta jariatzen dute.

Kaltzioaren garraioan parte hartzen dutela uste da (fosfatasa alkalinoa baitute).



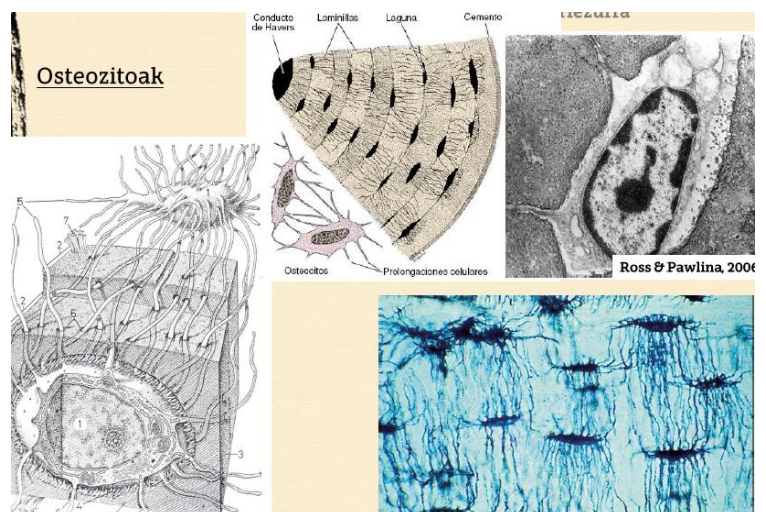
ME-z inguratuta geratzeko heldu direla esaten da eta **osteozito** izatera pasatzen dira.

## 3) Osteozitoak:

Hezuraren ME-ko aintzira izeneko barruguneetan kokatu, bat bakoitzean.

Oso nukleo handia eta luzakin zitoplasmatico oso luzea eta konplexuak dituzte. Luzakin hauek, matrizean dauden kanal txikietatik sartzen dira eta beste osteozitoekin nexu motako loturak eratzen dituzte. Horrela xafla bat bezala ordenatzen dira eta estimuluen aurrean modu kooperatiboan erantzun ahal izango dute.

EEP eta GA gutxi, baina inguruko hezurra birsortzeko gaitasuna mantentzen dute, kinada iristean.



Kaltzioaren metabolismo eta garraioan garrantzitsuak dira, hezuraren matrizea birxurgatu dezakete eta odolera  $Ca^{2+}$  askatu.

Oso modu ordenatuan antolatuta xaflatan.

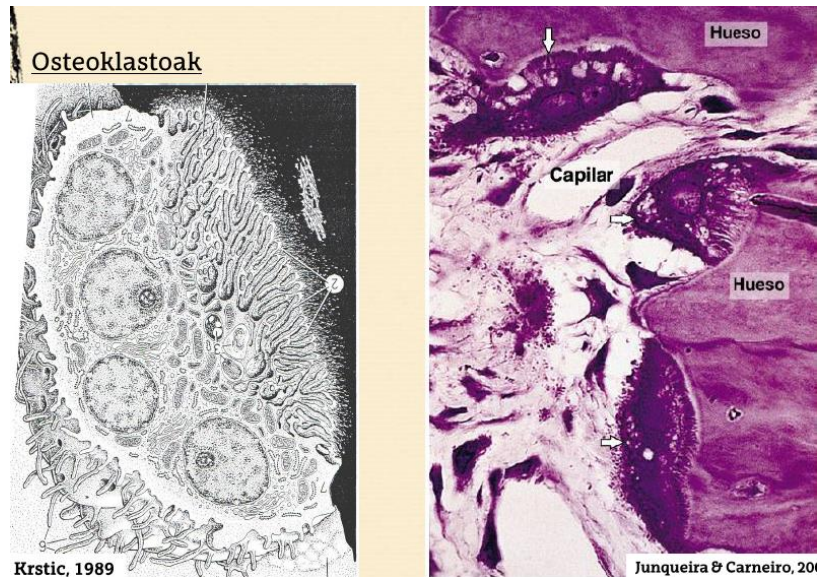
#### 4) Osteoklastoak:

Hezuraren agertzen den zelula mota berezia. Oso espezializatuak. Zelula oso handiak eta multinukleatuak (2-25 nukleo, normalean 4, 6 edo 8). Monozitoen fusioz sortuak (bigarren desberdintzapena jasaten dutenak).

Hezuraren azaleko Howship (laku modukoak) barreguneetan kokatzen dira

Funtzio nagusia eratutako hezuraren edo kartilagoaren suntsipena eta birxurgapena. Beraz funtzio nagusia liseriketa. Horregatik, mitokondrio, GA eta lisosometan aberatsak

Zelula oso polarizatuak, mikrobiloska ugari eta konplexuak → hezuraren azalerantza begira, kartilago edo hezuraren liseriketa efizienteagoa izan dadin. Bertan hezur matrizea liserituko duten entzima hidrolitikoak askatzen dira eta  $Ca^{2+}$  birxurgatzen dute odolera askatzeko



Irudiotan: Hezur edo kartilagoa begira dagoen zatiak tolesdura eta mikrobiloska asko. Horrela kontaktu A handitu egiten baita liseriketa optimizatuz; hemendik entzima hidrolitiko asko jariatuko dira.

#### Matrize estrazelularra:

- Kaltzifikatua, metabolitoen difusiorik ez
- Homogeneoa
- Baskularizatua (odol-hodiak)
- %50a matrize organikoa:
  - o I motako kolagenoa
  - o GAG (kondroitin, keratan...)
  - o Glikoproteinak (osteonektina)
- %50a gatz mineralak (inorganikoa):
  - o Fosfato kaltzikoa (hidroxiapatitua) → gogortasuna eskaini, portzentaiaren arabera gogortasun desberdinak
  - o Bikarbonatoa
  - o  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  ...

#### Gaineztadura:

Hezurra inguratzen duten ehun konektibo berezi bi daude:

##### 1) **Periostioa:** Ehun konektibo dentso zuntzezkatua.

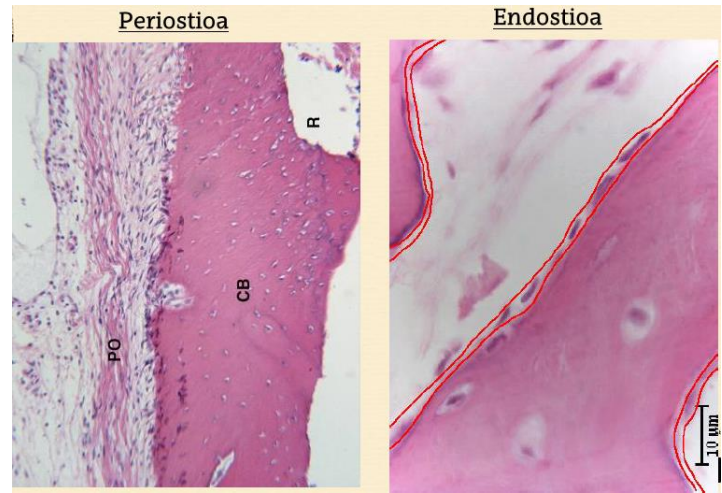
- Kanpoko azalerak gaineztatzen ditu artikulazioetan izan ezik



- Inerbatuta, nerbio bukaerak bertaraino heldu
- 2 geruza:
  - Kanpoko geruza: Fibrotsua, zuntzetan aberatsa. Ehun konektibo dentsoa. Baskularizatua. **Sharpey zuntzak**: periostioa hezur matrizearekin ainguratzen duten kolageno zuntzak.
  - Barne geruza: Osteogenoa. Ehun konektibo laxoa, zuntz gutxiago eta zeluletan (osteoprogenitoreak eta osteoblastoak) oso aberatsa. Elikadura eta hazkuntzaz arduratu.

## 2) Endostioa:

- Barnealdeko azalerak gaineztatzen ditu: trabekulak, hezur muina, Havers eta Volkman kanalak.
- Ehun laxoa da, zuntz gutxi eta zelula (osteogeniko eta osteoblasto) ugari
- Zelula osteogeniko lauen geruza → osteoblastoak → hazkuntza eta konponketaz arduratu
- Elikapena



## 3. Hezurketa: Hezurra beste ehun konektibotik eratortzen da.

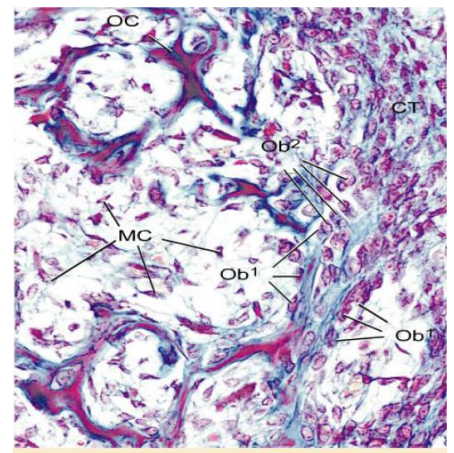
**2 hezurtze mota:** Bi orteogenesi horietan, hasieran hezur heldugabea (intramintzakara) sortuko da. Ondoren garapen prozesu batetik hezur helduak (laminarrak) sortuko dira.

### 1) Mintzakara edo desmala: hezur lauetan edo mintzakaretan, zabalagoak diren hezurretan. Prozesu nahiko sinplea.

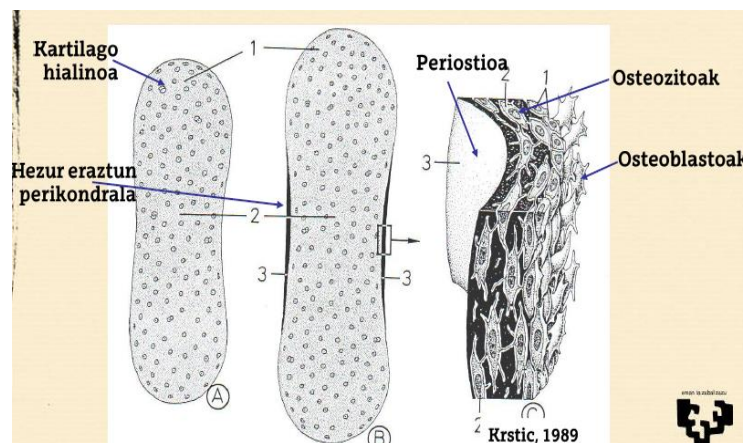
Zelula mesenkimatikoen taldekapenak sortu gune berezi batzuetan. Gune horietan ME dentso (osteoidea) eta kaltzifikatua sortuko da. Barruan gelditu diren zeluletara, zelula mesenkimatikoetara, seinale bat heltzean, desberdintzatu eta osteoblasto bihurtuko dira. Osteoblasto hauek, beraiek sintetizatzen duten (I motako kolagenoa, hidroxiapatittoa) matrizean murgilduta geratzean, osteozito bihurtuko dira.

Hasierako zelulen taldekapena inguratzen zuen ehun konektiboa periostio eta endostio izatera pasatuko da.

Hezur lauetan gertatzen den prozesua da: garezurra, aurpegia, klabikulak...



### 2) Kondrala edo endokondrala: Hezurra kartilagotik (egitura kartilagenosoa) sortzen da, hau ordezkatu. Hezur arola eta trinkoa sortuko ditu. Prozesu konplexua.

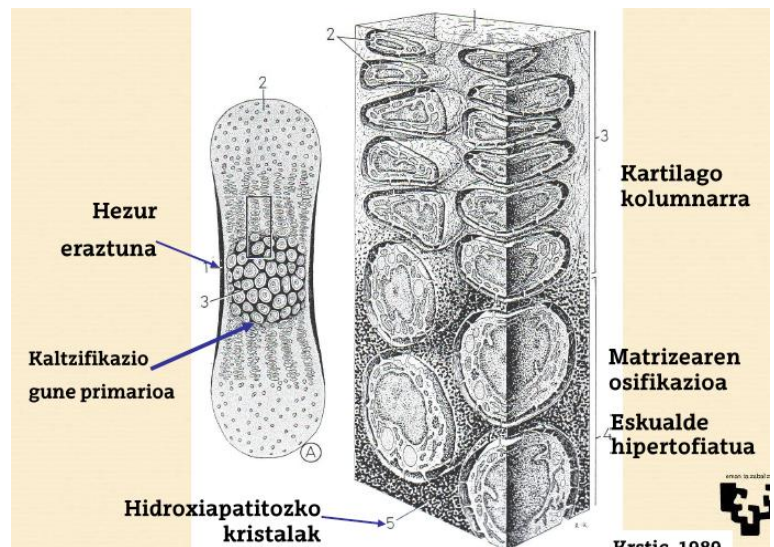




Beti **kartilago hialinoa** egon behar da. Momentu batean, kartilago horretan zehar, diafisiaren inguruan, hezurrezko geruza bat eratzen hasten da: erdialdeko zenbait zelula desberdintzatzen hasiko dira, **osteoblasto** bihurtu eta **hezur eraztun perikondrial**a eratuko da. (1)

Orduan, kartilagoko kondroziotoetan zenbait aldaketa gertatuko dira: hipertrofiatu, zutabeetan antolatuz migratuko dute eta tamainaz handitu. Horrela, kartilago kolumnarra sortuko da (kartilago hialinoaren parakuntza berezi bat). Kartilagoa luzatuz doa. (2)

Gero, diafisiko kartilagozko matrizea kaltzifikatzen hasten da eta egitura gogortzen. (3)

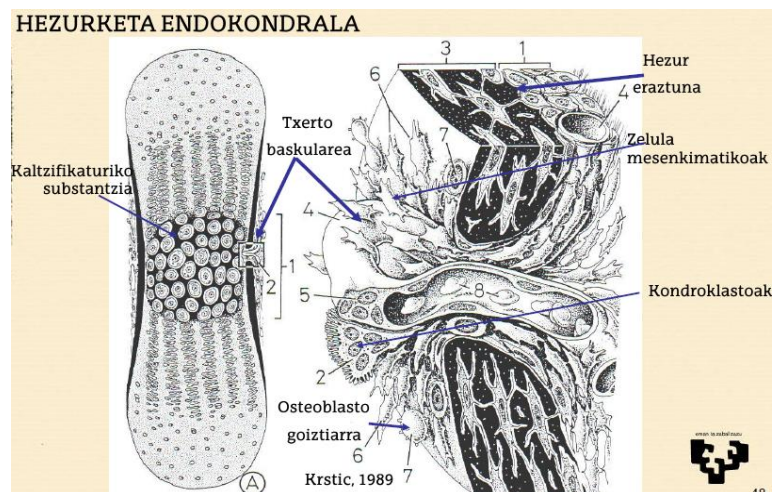


2

Beranduago hezur eraztuna apurtuko da (osteoklastoek liseriketa burutuko dute periostioa joango den gunean) eta odol-hodi bat barneratuko da kartilagoa hipertrofiaturik dagoen gune horretatik. (4)

Odol hoditik odola barneratuko da, osteoblasto zein osteoklastoen garraiatzailea dena. Osteoklastoek kartilago hipertrofiatua liserituko dute, zutabeez baliatuz kanalak sortzeko. Kanal edo barrunbe horiek, zelula osteoprogenitoreen bidez, osteoblasto zein odoleko bestelako zelulez beteko dira eta hauek ere zuloak handitzen jarraituko dute. Erdialdetik ertzetara zabalduko da egitura berria. Pixkanaka kaltzifikaturik dagoen gunea odol-hodiz betetzen joango da. Kondroziotoak ordeztuz doaz.

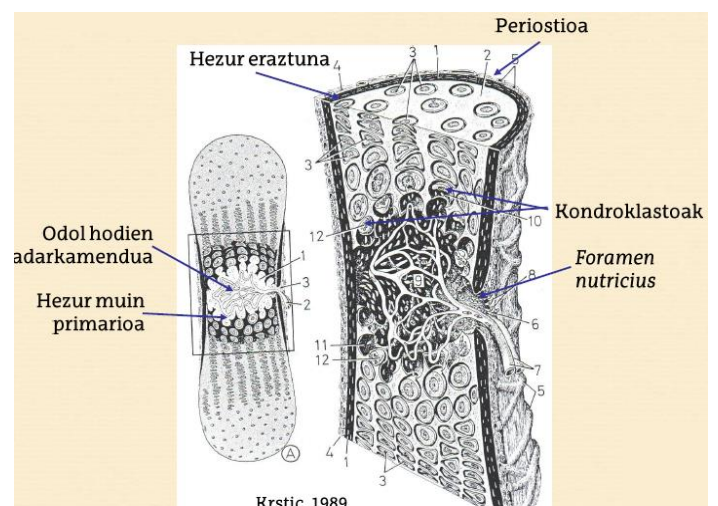
(4-5)



3

Hezurra oso luzea bada (erradioa, adibidez), prozesu honen ostean, bi muturretan erdialdean gertatu den prozesu bera gertatuko da. Horrela, osifikazioaren zentru sekundarioak eratuko dira. Ez da eraztunik eratuko, liseriketak utzitako zuloetatik zuzenean odol hodiak sartu. (5)

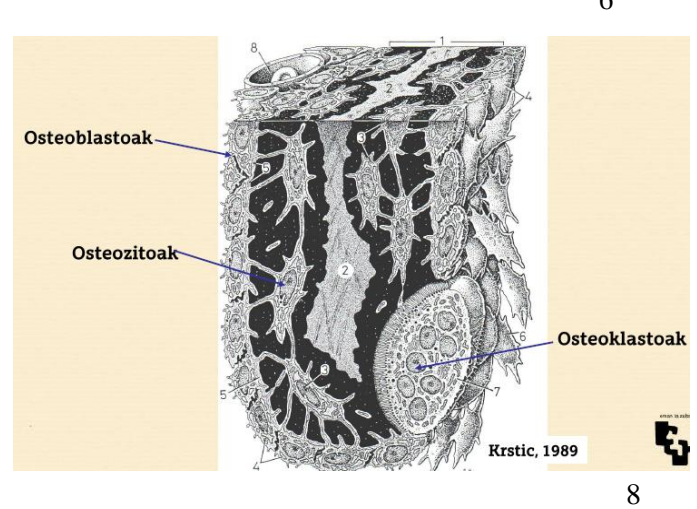
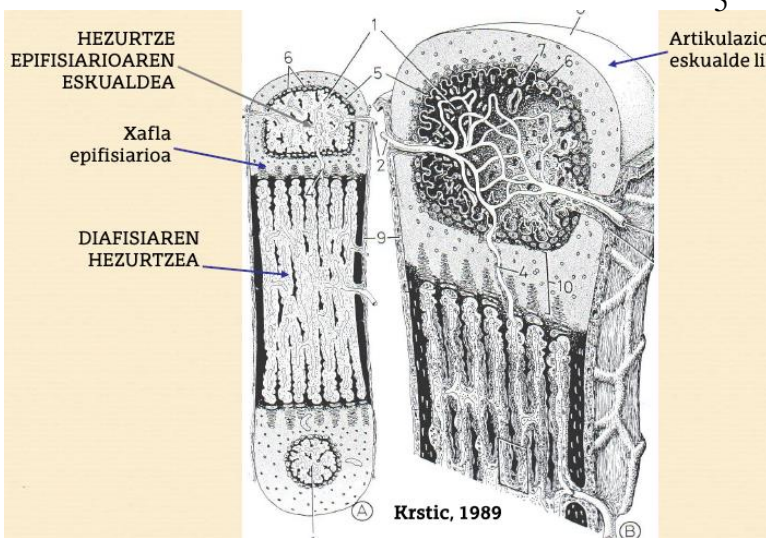
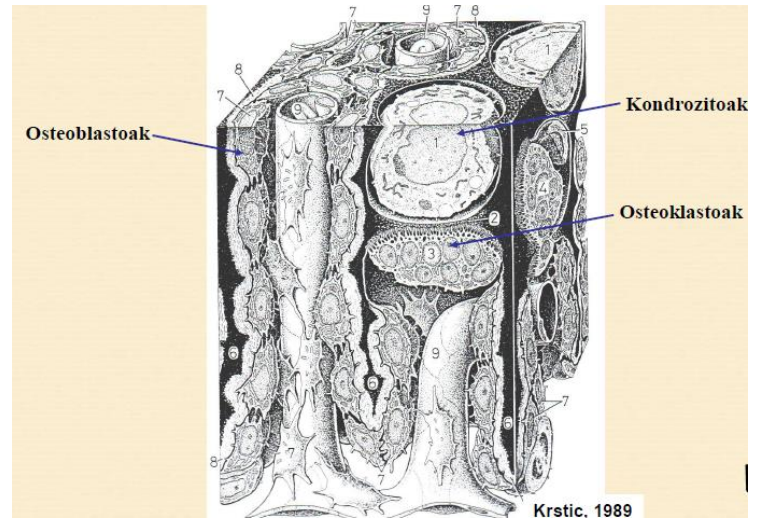
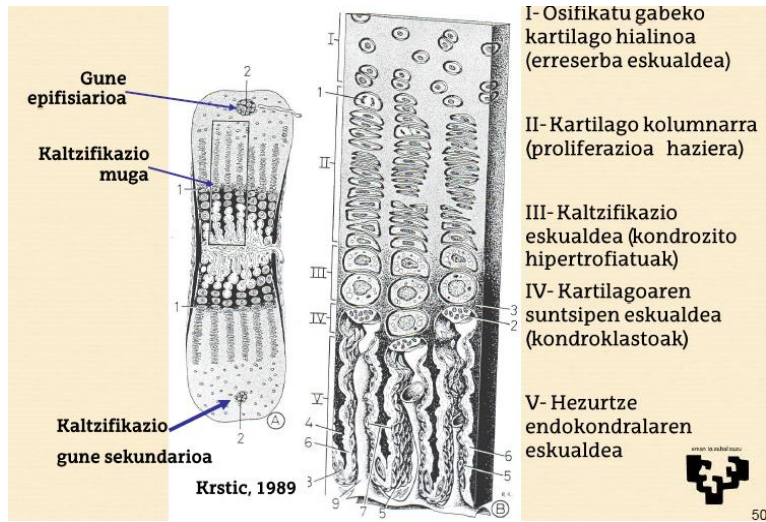
Era honetan, xafla epifisiarioa (7) eratu da, epifisietako gune sekundarioen eta diafisiko hezurketa primarioaren artean. Hezur



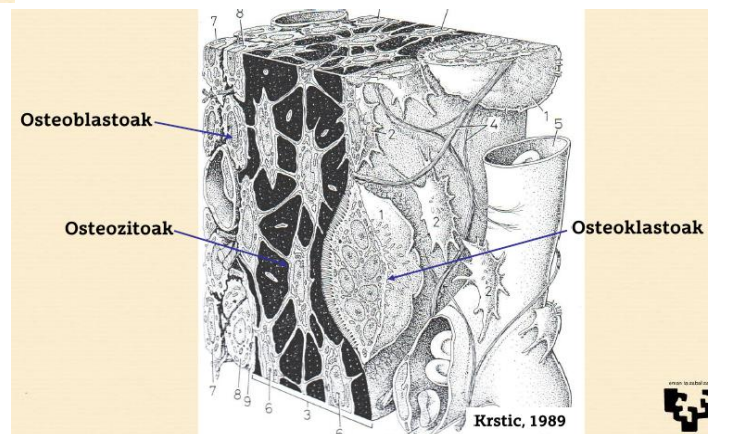
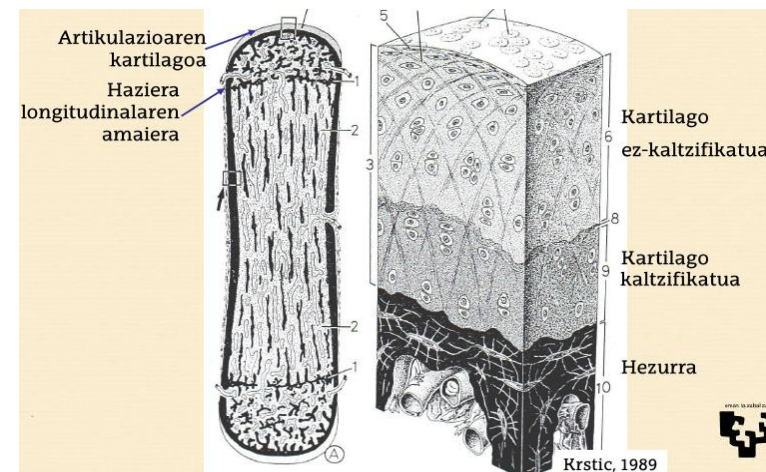
4



luzeak hazten jarraituko du eta momentu batean, xafla epifisiarioa desagertuko da (batzuetan mantentzen da). Momentu honetan ez dago metafisi eta epifisiaren arteko bereizketarik, bakarrik lerro epifisiarioak geratzen dira.(9)



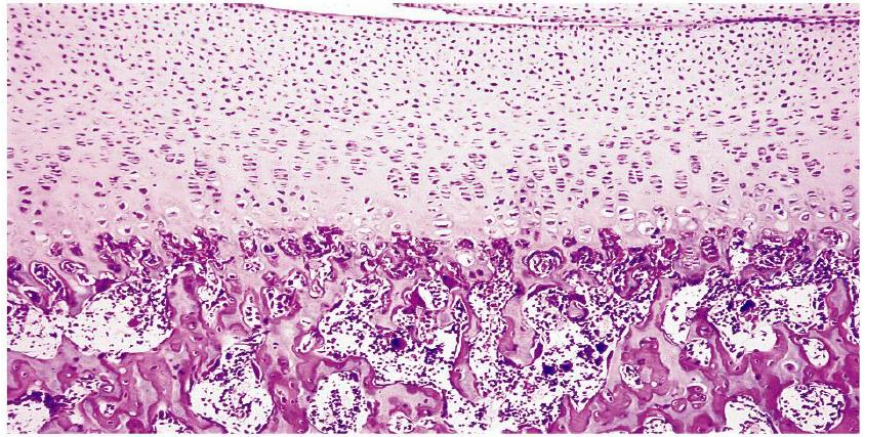
Irudiotan: Egitura kartilagenatsua dagoeneko hezurragatik 7 ordezkatu izan da.



Hezurra, osteoklastoekin. Kartilago guztia ez da ordezkatu izaten, frikzio guneetan batez ere; kartilagoa errazagoa baita ordezkatzeko.



Alde homogeneoan (goian) kartilago hialinoa. Behean zutabeetan antolatuta, kartilago kolumnarra. Osteoblastoek matrize berria sortu (beran), osteoklastoek zuloak egin....

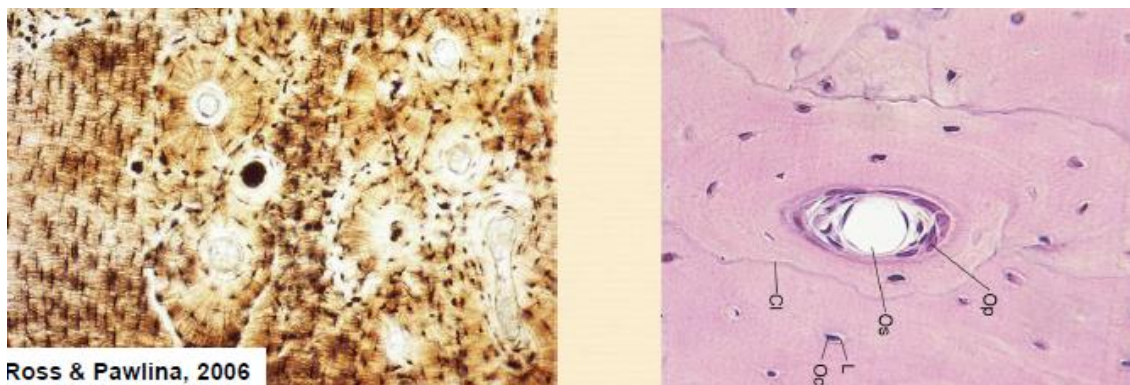
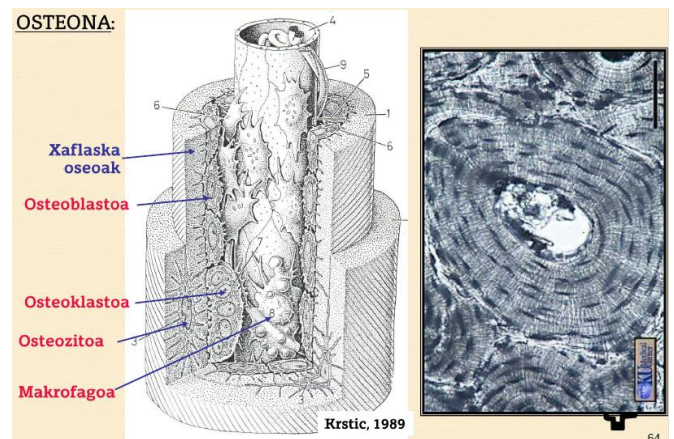


#### 4. Antolaketa histologikoa

Hezurra oso egitura antolatua da, osteona izeneko unitatea milaka aldiz errepikatzen da. Osteonaren erdikaldean dagoen odol hodiari, kapilarea agertzen den konduktuari, Havers kanala deritzogu. Honen inguruan osteozitoak eta endotelioa (elkarren artean konektatuta luzakin zitoplasmatikoei esker).

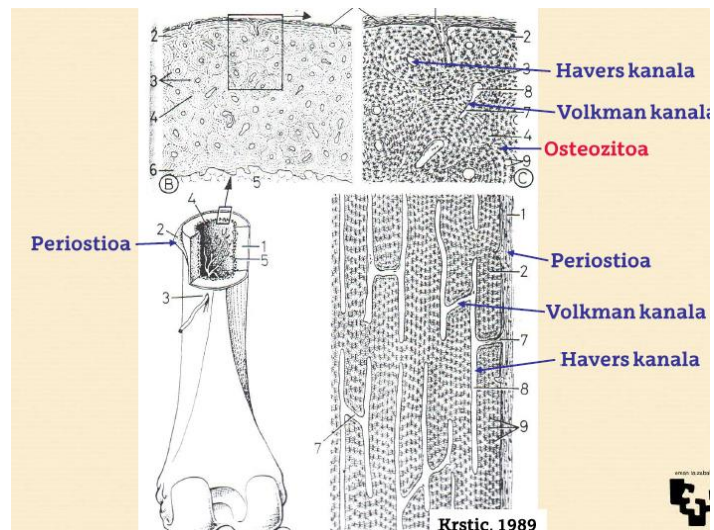
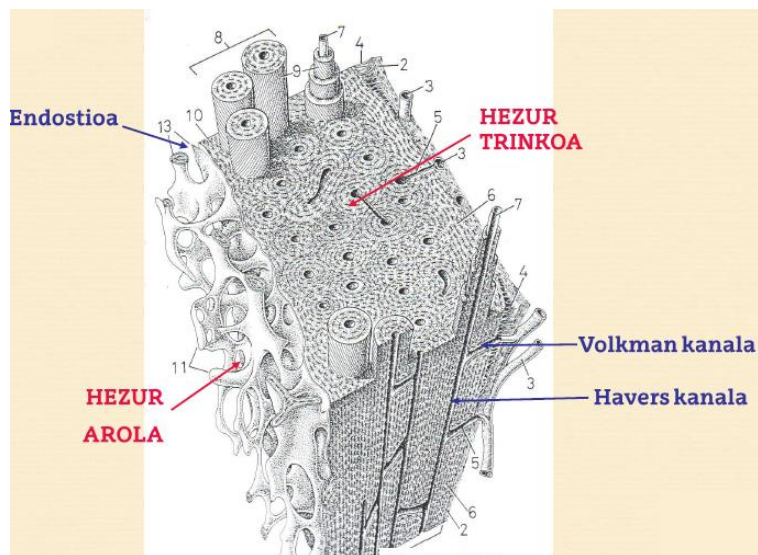
**Osteona**(=Egitura osoa=odol hodia + endotelio + geruzak+ ...): unitate estrukturala

- Osteozitoak xaflaka zirkular kontzentrikoetan antolatzen dira kapilare baten inguruan (egitura odoleztatua)
- Kapilarea agertzen den konduktuari Havers kanala deritzo
- Havers kanalak beraien artean komunikatzen dituzten kapilaredun konduktuak Volkmann kanalak dira. Hauetan osteozitoak ez dira xaflaka kontzentrikoetan agertzen
- Tartean ME kaltzifikatua dago



Havers kanal inguruan; osteozitoak+endotelioa (elkarren artean konektatuta luzakin zitoplasmatiko bidez)





### Dentina:

Odol hodorik gabeko ehun mineralizatua da, hezurren antzekoa.

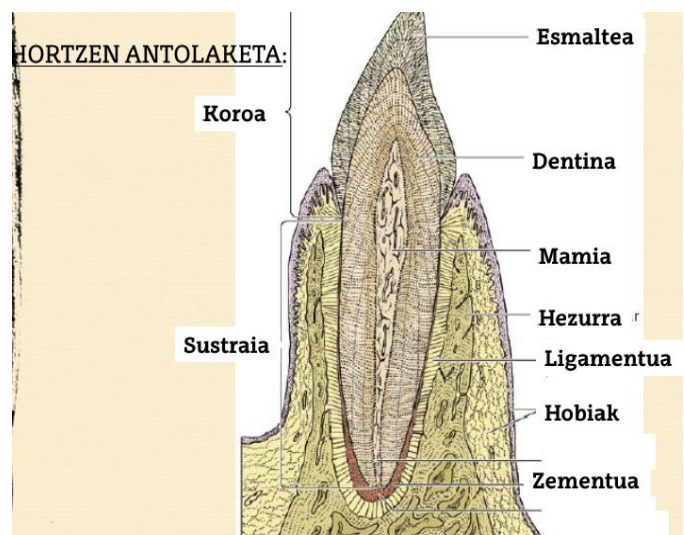
- Esmaltea: geruza fina, gogorra eta
- Dentina: ME oso katzifikatua (hidroxiapatitua %75 inguru, hezurretan %50 inguru). Ugariena. Esmaltearen azpian kokatua.
- Mamia: ehun konektibo laxo tipikoa. Zelula mesenkimatikoak eta oinarritzko substantzia asko. Odol-hodiak.
- Zementua: ehun kaltzifikatuz osatutako hori koloreko geruza fina, dentina baino bigunagoa.

Mamia eta dentina artean odontoblasto deritzen zelula bereziak daude, dentina sintetizatu eta jariatzen dutenak. Ondorioz, euskarri funtzioa edukiko dute. Epitelio bakun kolumnarra eratzen dute. Luzakin zitoplasmatiko bereziak, Tomes zuntzak izenekoak, dituzte, hagin guztian zehar zabaltzen direnak. Tomes zuntzen tartean kokatzen da dentina. Azkenean, odontoblastoak ME horretan murgilduta geratuko dira.

Jatorria zelula mesenkimatikoa. Berriztapen maila nahiko baxua.

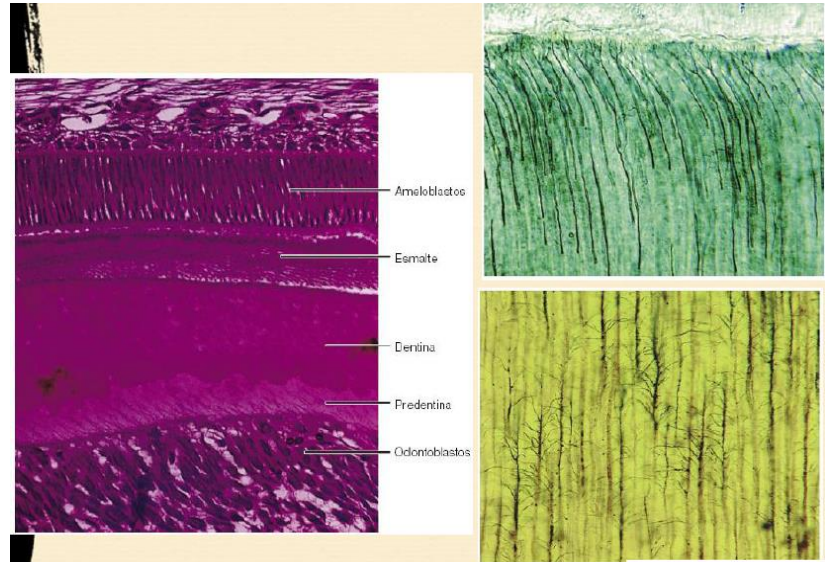
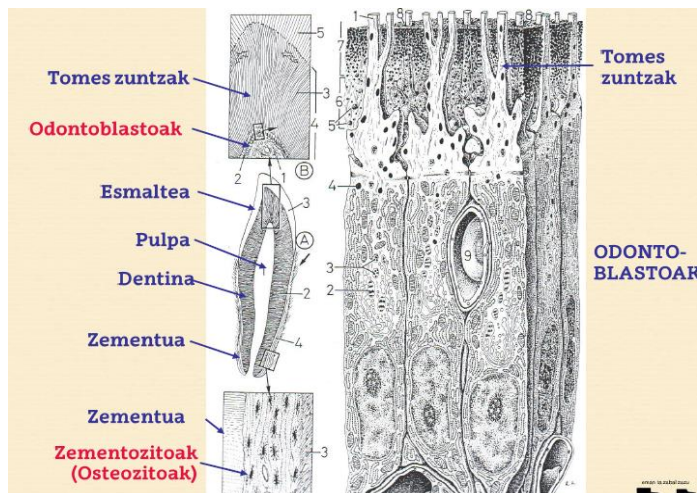
Hagina sortuko duten odontoblastoak oraindik kanpora atera gabe daude. Hauek ME-ko osagaiak jariatzen jardungo dute, eta odontoblasto horien gainetik, beste zelula berezi batzuk kokatzen dira: **ameloblastoak**. Ameloblastoek esmaltea sintetizatu eta jariatzen dute eta matrize horrek dentina inguratzen du.

Garapenean zehar, ameloblastoak eta odontoblastoak itsatsita egon ohi dira, baina bigarren hauek dentina jariatzen, hau tartean jarri eta natu egingo dira.



Dentina kopuru zehatz batetara iristean soilik aktibatuko dira ameloblastoak, esmaltea sintetizatu eta jariatzen hasteko. Hauen berriztapen tasa ere baxua.

Behin hagina osatuta, kanporatu egiten da, ameloblastoak desagerraraziz. Hortza hausten dugunean, mina sentitzen bada, esmaltea puskatu delako da; mina sentitzean dentinara iritsi garela esan nahi du.



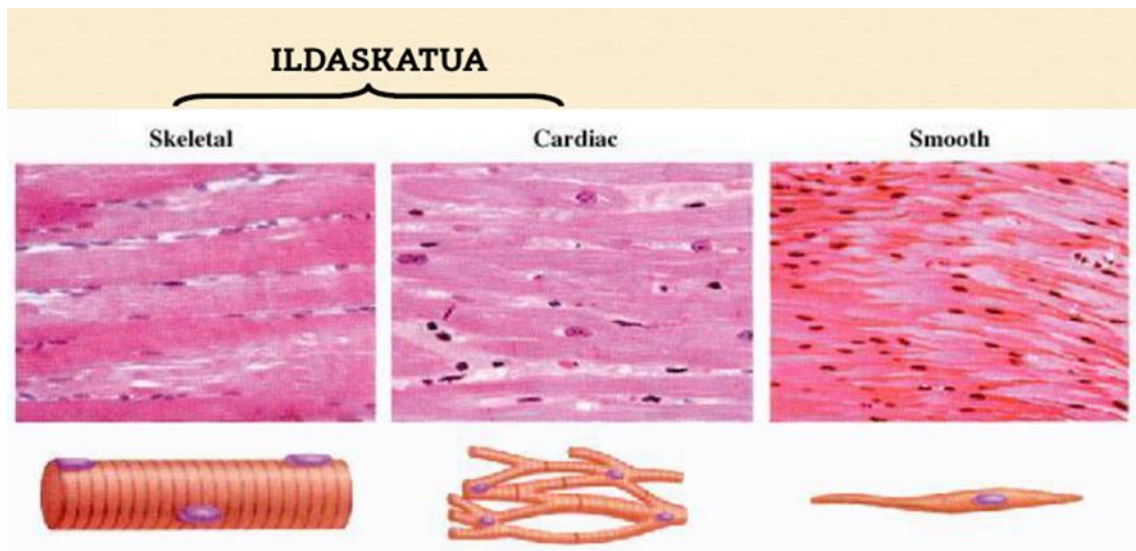
## 8. Muskulu ehuna

### 1. Kontzeptua eta sailkapena

- Zelula guztiek dute uzkuertzeko eta mugitzeko ahalmena. Hala ere, solik zelula muskularrak daude funtzio hauetan espezializaturik. Organismoaren mugimenduaz arduratzen dira.
- Zelula oso bereziak dira, antolaketa espezializaturik eta zatitzeko ahalmen mugatua
- Muskulu ehuna zelula desberdintzatuz osaturik. Aberatsak **proteina uzkurkorretan: aktina, miosina, paramiosina**... Normalean **sarkomeroak** eratzen.
- Proteina uzkurkor hauen egitura fisiologikoak zelulen uzkurketarako beharrezkoa den indarra sortzen du. Era berean, organoen eta gorputz osoaren mugimendu koherentea sortu.

**Sailkapena:** Xingolak agertu edo ez agertzearen arabera sailkapena

- Leuna: Animalia talde guztietan, artropodoetan (intsektuak, krustazeoak) izan ezik. Oso ugaria eta xingola gabea.
- Ildaskatua: Sarkomeroek xingolak edo ildaskak ertu.  
Bi mota ildasken norabidearen arabera:
  - Ildaskatu transversala:
    - Z xingola jarraiekin: eskeletikoa (artropodo eta ornodunak) eta kardiakoa (ornodunak)
    - Z xingola ez-jarraiekin: moluskoak (ornogabeak)
  - Ildaskatu helikoidala: nematodoak, anelidoak, moluskuak, brakiopodoak, ketognatoak



**\*Terminologia:**

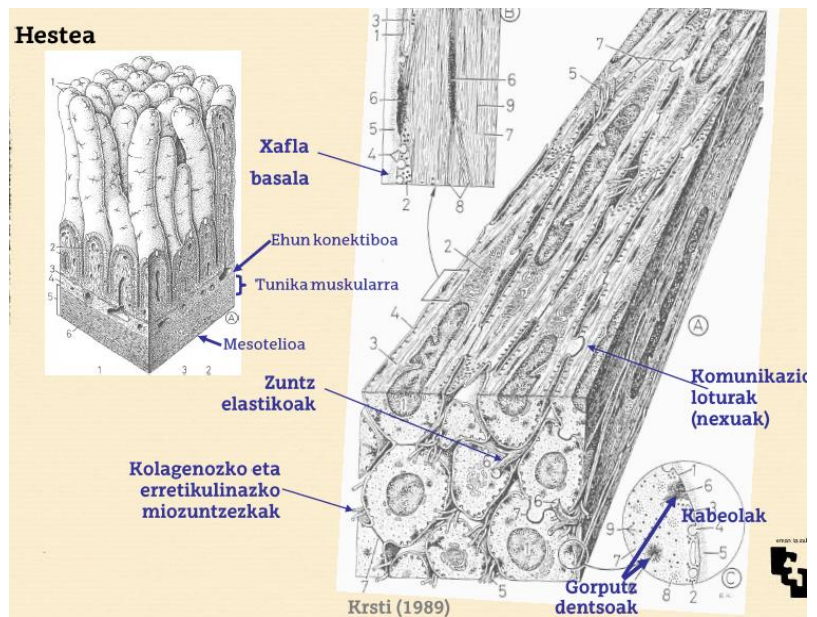
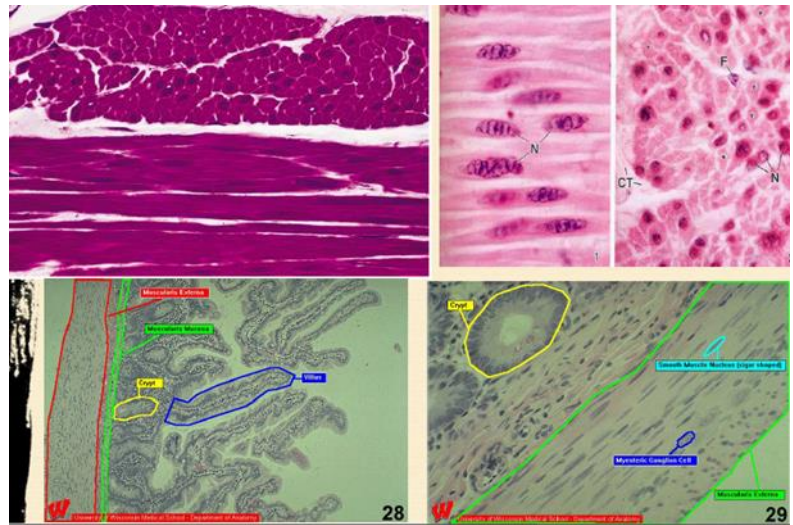
- Zuntz muskularra: zelula muskularra; izugarri egitura luzeak dira, eta zuntz antza hartzen duela dirudi.
  - Miopiruak: zelula muskularretan agertzen diren piru
    - berezi batzuk dira (tropomiosina, miosina, aktina... piruak)
  - Miozuntzak: miopiruen taldekak
- } Zuntz muskularren barruan



- Erretikulu sarkoplasmatikoa: zelula muskularretan espezifikoa den eta kaltzio asko duen erretikulu endoplasmatiko berezia eta garrantzitsua
- Sarkolema: muskulu zelulen mintz plasmatikoa da. Batzuetan xafla basala eta zuntz erretikularrak barneratzen ditu (batez ere muskulu ildaskatu eskeletikoan).
- Sarkomeroa: muskulu ildaskatua osatzen duten miozuntzen antolaketa berezi eta ordenatua da.
- Sarkoplasma: muskulu zelulen zitoplasma da; bertan nukleoa, Erretikulu sarkoplasmatikoa eta miozuntzetan antolatutako miopiruak daude.

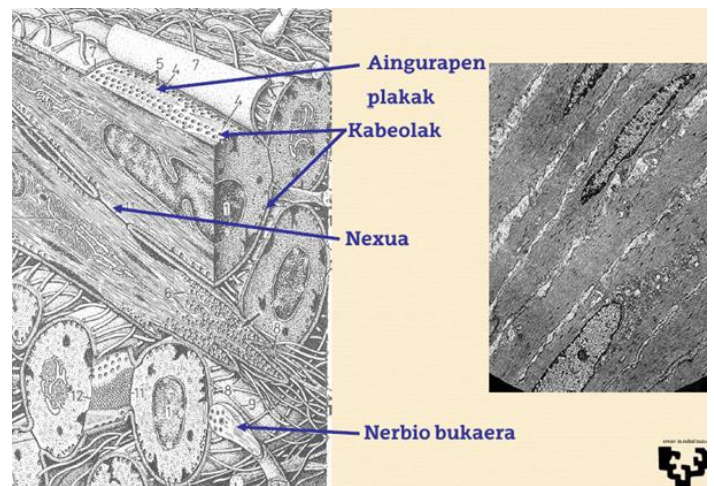
## 2. Muskulu leuna

- Organoen paretetan kokatzen da
- Zelula luzeak eta fusiformeak. Taldekatzerakoan azauak edo xaflak eratu. Oso ohikoa zelulak taldekatuta agertzea.
- Aktina eta miosina miozuntzak elkarrekiko eta zelularen ardatz nagusiarekiko paraleloki paratuta daude.
- Ez dago miozuntzen antolaketarik → nahiz eta aktina eta miosinaren parakuntza berezia izan, ez daude guztiz ordenatuta eta horren ondorioz ildaskak ez dira ondo bereizten
- Miozuntzak elkarren artean edo mintz plasmatikoarekin lotzen diren tokietan gorputz dentsoak (**aingurapen plakak**) agertzen dira.
- Nukleoa erdian
- Honen inguruan → zitoplasma perinuklearra: mitokondrioak, EE, erribosomak eta glukogenoa. Uzkurkorra izanik, mitokondrioetan eta erreserba materialetan aberatsa (glukogeno eta lipido tantak) energia behar delako.
- Xafla basala eta ehun konektibo erretiformearen geruza mehea: egitura hauek desagertu egiten dira zelulak beraien artean nexuen bidez lotzen diren eskualdeetan
- H/E tindaketan oso larrosa

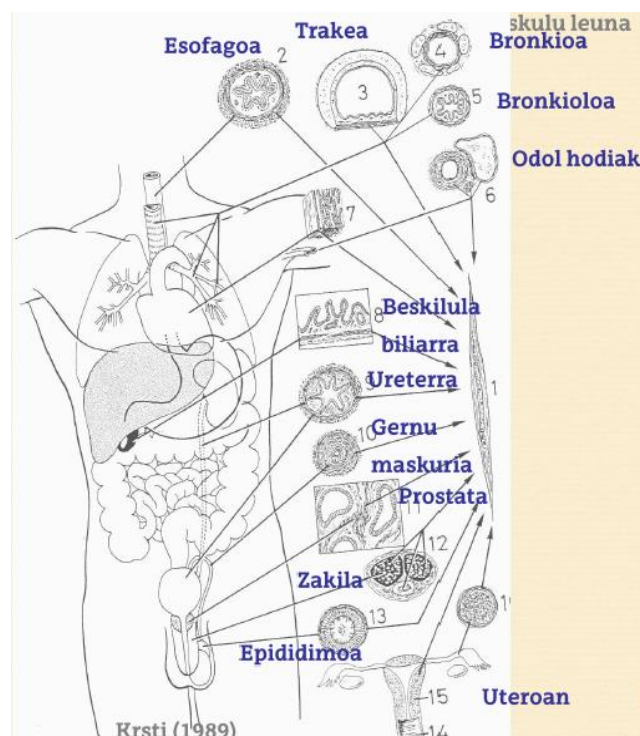


Zelulek **nexuak** erakusten dituzte haien artean komunikatzeko. Adibidez: hestea, oso hodi luzea da eta bertatik elikagaiak bideratzen dira, digerituz doaz, energia lortzen da... Muskulu leunak, prozesu guzti hau modu kordinatuan eta era dinamikoan egitea ahalbidetzen du.

Zenbait kasutan, berezitasun gisa, zelula hauek endozitatzeko ahalmena erakusten dute eta **kabeolak** ikus daitezke (metabolismoaren arabera kantitate desberdina



### Kokapena:

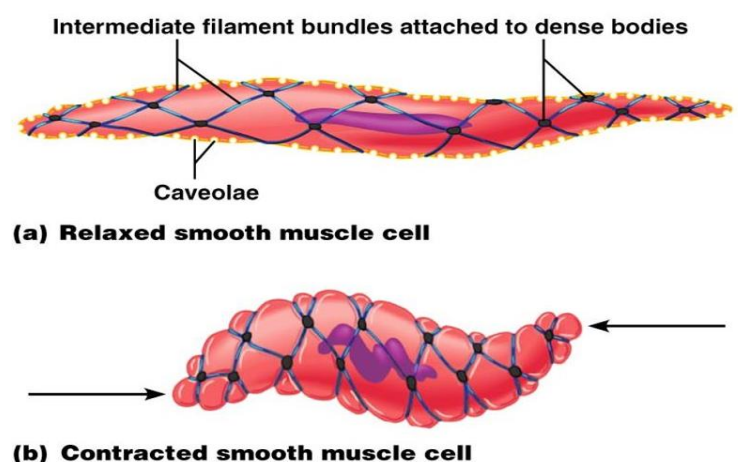


### Uzkurketa:

Gorputz dentsoetan, miozuntz batzuk besteekiko irristatzen dira eta tentsioak sortzen dira. Hauek, aingurapen plaken bitartez mintzari lotuta daudenez, hau da, miopiruen mutur guztiak hemen ainguratuta daudenaz, azkenenean, zelula osoa uzkuertzen eta tamainaz txikitzen da. Motela baina bortitza. Energia kontsumo urrikoa.

### Histogenesia:

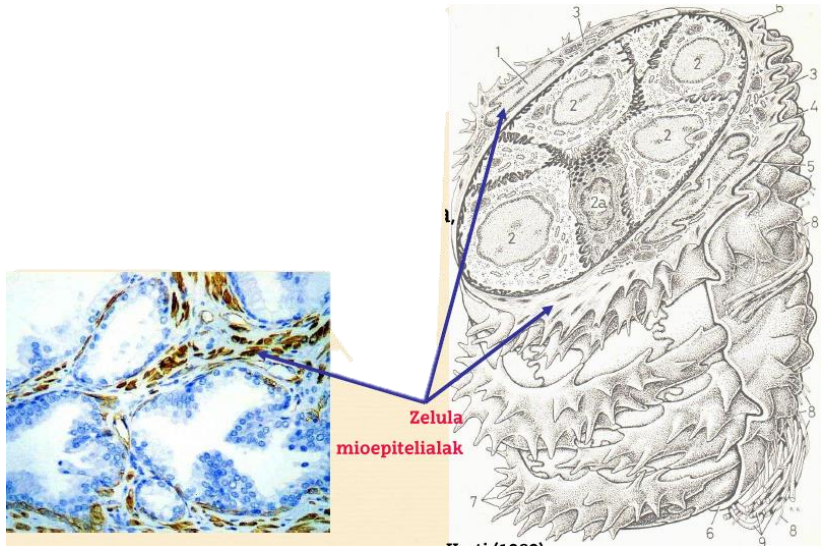
Muskulu zelulak zelula mesenkimatikoetatik eratortzen dira eta beraz, jatorri mesodermikoa dute





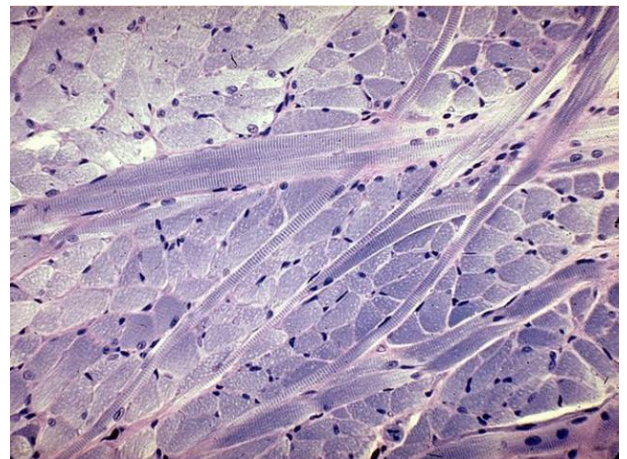
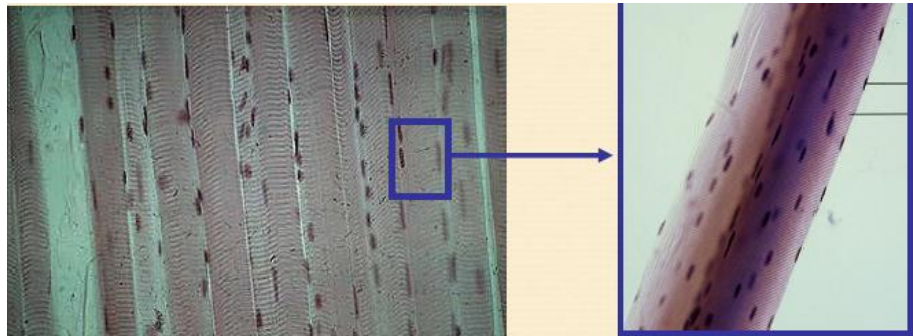
### 3. Zelula mioepitelialak

- Ektodermotik eratortzen diren zelula bereziak
- Aktina eta miosinazko antolaketa desberdina dute
- Uzkurketa prozesuetan espezializaturiko zelula epitelialak dira, eta muskulu leuneko zelulen itxura dute, batez ere uzkurketetan
- Funtzioa: Jariapen guruinen inguruan kokatzen dira modu espezifikoak. Uzkurtzean guruinen jariapen prozesuetan lagundu (listu guruina, ugatz guruina, malko guruina, ...). Jariapen holokrinoan nahiko garrantzitsuak



### 4. Muskulu ildaskatu eskeletikoa

- Ehun mota honen ezaugarri diren **ildaskak** erakusten ditu: aktina eta miosina modu berezian antolatu
- Unitate estrukturala eta funtzionala muskulu zuntz ildaskatua da: zelula zilindriko multinukleatua
- Hainbat muskulu zelulen **elkartze sintzizialaren** (zelulen fusioa) ondorioz sortu
- Oso luzeak eta ehundaka nukleo izan ditzakete
- Nukleoak itxura luzea dute eta zuntzen periferian kokatzen dira
- Zitoplasma gehiena aktina eta miosina zuntzez beteta: sarkomeroak oso ongi antolaturik
- Gune perinuklearrean (zelularen ertzean) diktiosomak, mitokondrioak, lipidoak eta glukogenoa daude



Seguraski mingaina. Luzetara moztuta dauden zeluletan sarkomeroa ikusten da, besteetan nukleoa soilik.

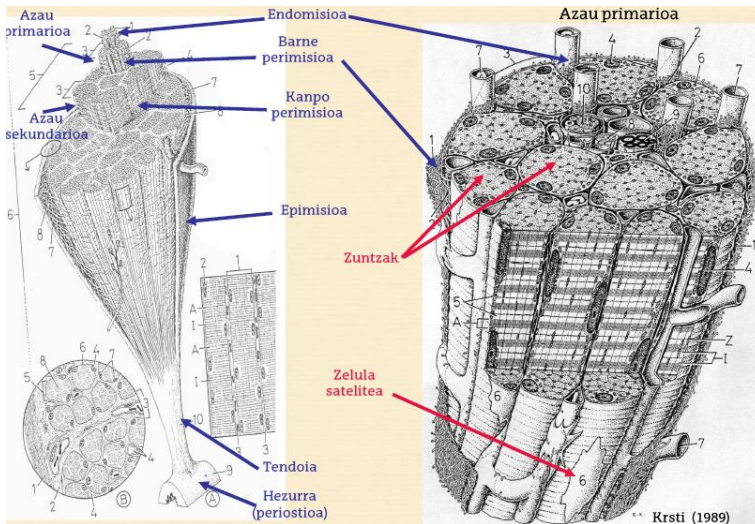
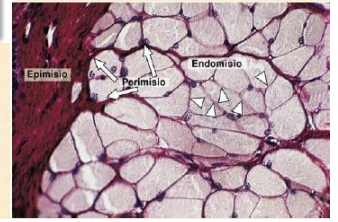
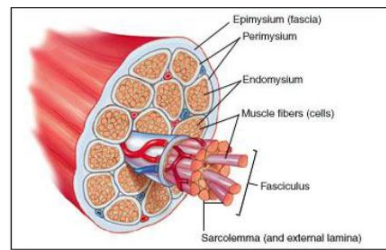
#### Ehunaren antolaketa:

- Muskulu zuntza
  - Zelula ildaskatu plurinukleatua
  - Xafla basalez eta ehun konektibozko gaineztadura batez, **endomisia**, inguratuta
- Muskulu azaua
  - Zenbait kasutan zelula horiek taldekatu egiten dira
  - **Perimisia** izeneko ehun konektibozko geruza batez gaineztatuta



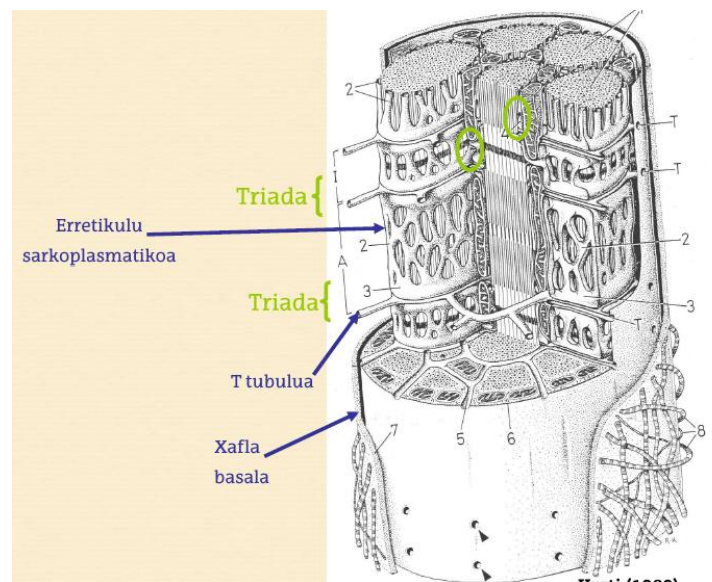
- Muskulua:

- Muskulu azauak ere taldekatu egiten dira, muskulua eratuz
- **Epimisio** izeneko ehun konektiboaren (zuntzekatu dentsoa) geruza batez gaineztatuta

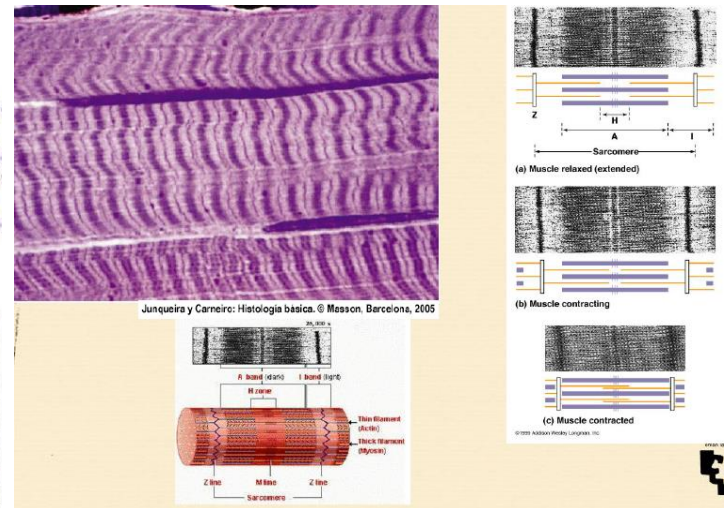
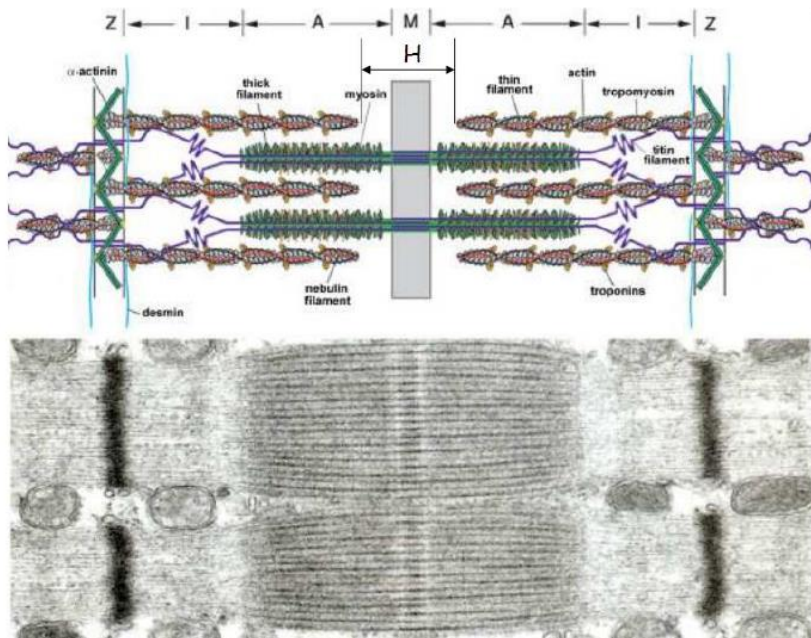


Muskulu zelula ildaskatu baten erdialdea, aktina eta miosinaz beteta. Inguruan erretikulu sarkoplasmatikoaren hainbat zisterna eta inguruan mintza.

- I eta A xingolen kontaktu eskualdeetan, erretikulu sarkoplasmatikoa adarkatzen da **triadaren** osagai moduan parte hartzeko.
- **Erretikulu sarkoplasmatikoa:** berezia. Hainbat zisternaz osatuta, oso modu berezian antolatuta → Zelula muskular ildaskatuaren erdialdean aktina eta miosinak osatzen duten sarkomeroa eta inguruan zisternak. Gainetik mintza, **sarkolema**. Mintzera begira mitokondrioak.
- Mintz horretan tolesdura edo inbaginazio bereziak agertzen dira zelularen barnealderantz, **T tubuluak**.
- **Triada** erretikulu sarkoplasmatikoaren bi zisterna eta T tubulu baten elkarretaratzea da. Ez dago osagaien mintzen arteko fusiorik. Modu erregularrean agertu muskulu eskeletikoan.
- Erretikulu sarkoplasmatikoak  $Ca^{2+}$  metaleku moduan jokatzen du eta T tubulua muskulu zelularen mintzaren despolarizaioa transmititzeko erabiltzen da. Honela  $Ca^{2+}$  ioiak zitoplasmara askatzen dira. (muskulua asko aktibatu)



2 zenbakia erretikulu sarkoplasmatikoa

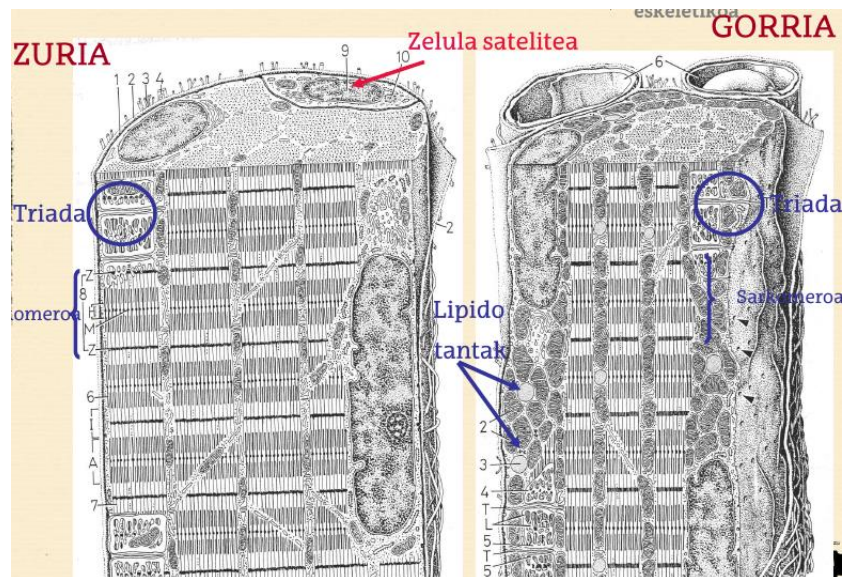


I eta A xingolak

### Muskulu eskeletikoaren zuntz motak:

Ornodunen hainbat taldetan muskulu ildaskatu eskeletiko bi mota desberdintzen dira, zuria eta gorriak

- **Zuriak:** zelula zabalagoak. Mitokondrio eta mioglobina gutxi. Uzkurketa azkarrak eta arinak. Azkarrago nekatu oxidazio ahalmen urriagatik (hartzidura), hau da, uzkurketa ezin dute denboran zehar mantendu. Momentu zehatz batean mugimendu azkarra egiten duten animalietan agertu.
- **Gorriak:** diametro txikiagoa, sarkomero estuagoa, miozuntzezka gutxi. Uzkurketa geldoagoa, baina denboran gehiago mantendu. Honen inguruan baskularizazio hedatua eta mitokondrio asko, luzaroan zehar mugitzeko beharrezkoak. Mioglobina gehiago. Denboran zehar asko mugitzen den animalietan.



Konbinaketak agertzea oso ohikoa da, zuriak zein gorriak batera. Mikroskopiaan gorriak ilunago agertu. Biak dira eskeletikoak baina sarkomero desberdina osatu.

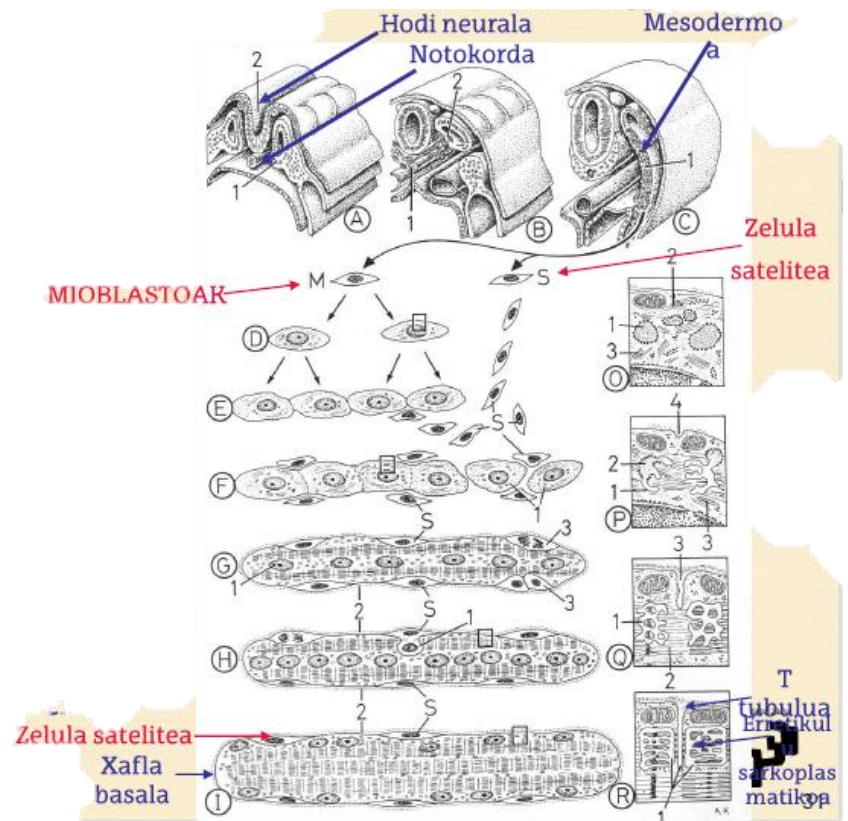
### Histogenesia:

Jatorri mesodermkoa, zelula mesenkimatikoetatik. Hodi neuralaren ingurutik, zelula mesenkimatikoak proliferatu eta mioblastoak deritzen zeluletan desberdindu. Kopuru jakin bat lortzean hazi eta fusionatuz joango dira, mioblasto plurinukleatuak eratuz. Fusioaren ondorioz, miozuntzezka (aktina eta miosina) garatzen doaz, sarkomeroa sortuz.



Hala ere mioblasto batzuk ez dira desberdintzatzen eta mintzaren ertzetan, zuntzen inguruan, agertzen dira. **Zelula satelliteak** deritze. Kalteak daudenean desberdintzatzen hasi eta konpondu. Oso gutxi daude.

Zelula desberdintzatuak, aldiz, ezin dira gehiago zatitu, kromosomen migrazioa ezin da eman, aktina eta miosinaz beteta daudelako eta plurinukleatuak dira; beraz, heldutasunera heltzean ezin zatitu.



**Berrerraketa:** Konponketa kaltearen arabera izango da

- **Jarraia:** Gune batean soilik geratu den apurketa. Makrofagoek liseritu eta garbitu berrerraketarako gunea. Inguruneke zuntzen eta zelulen zitoplasma eta nukleoak hutsunea bete arte mugitzen dira. Nukleoak lerrokatzen aktina eta miosina sintetizatzen hasi eta konpondu.
- **Ez-jarraia:** Oso gune handia denean edo ezin bada berriztatu. Makrofagoek liseritu eta garbitu berrerraketarako gunea. Orduan, zelula satelliteak zatitu, zuntzaren erdialdera mugitu eta mioblasto bihurtzen dira. Fusioa gertatzen da. Berriz ere nukleoak lerrokatu, mintzak fusionatu eta aktina eta miosinatik sarkomero berri sortuko dira, ehun muskularra konponduz.

#### BERRERAKETA:

Nukleoen hipertrofia

Periferiaranzko migrazioa

Makrofagoa

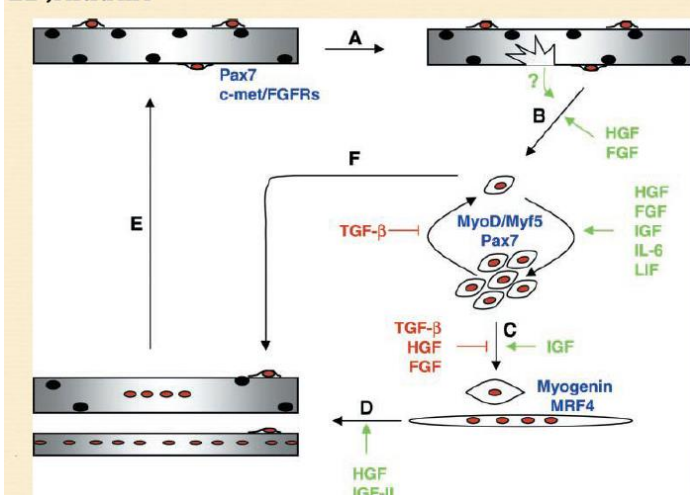
Zelula satellitea

Periferiaranzko migrazioa

JARRAIA

EZ-JARRAIA

#### EZ-JARRAIA



Kalte bat dagoenean: hazkuntza faktoreak bidali gune horretara (HGF, hepatozito grow factor eta FGF fibroblast grow factor). Seinale horien aurrean, satelliteek, miogenina eta mrf4 aktibatzen. Bi hauek, zelula muskular helduen kasuan bi hauek aktibatuta daude, satelliteetan ez. MRF4 desberdintzapenaren azken faseetan agertu.

Inguruko zelulek bidali hazkuntza faktoreak. Miogeninak aktina eta miosinaren gene promotoreetan eragin aktibatuz eta aktina eta



miosina sintetizatzen hasi. Gune kaltetuaren inguruko zelulek bidali hazkuntza faktoreak. Zelulak desberdintzatuz, proliferazioa eman.

Inguruko fibroblastoei, edo makrofagoekin datorren odoleko plaketek eman seinaleak.

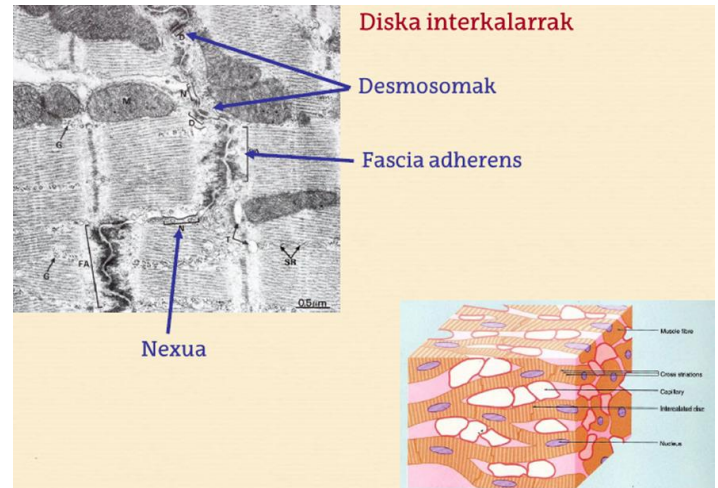
## 5. Muskulu ildaskatu kardiakoa

- Zelula mononukleatuak (zenbait kasutan bi nukleo ere)

- Nukleo zentrala
- Zelula txikiagoak, mintzak oso gertu
- Mitokondrioetan aberatsak
- Mugimendu ez-boluntarioak eta taupadaka: ez ditugu modu konzientean kontrolatzen, **bihotzaren inguruan.**

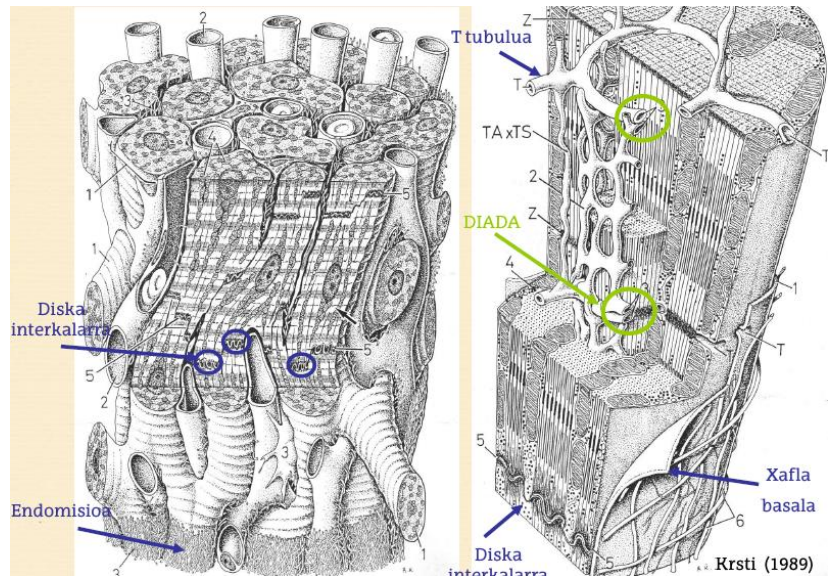
- Adarkaturiko zelulak → beraien artean diska interkalar izeneko lotura konplexuaren bidez konektaturik

- **Diska interkalarretan** desmosomak, fascia adherens eta nexu motako loturak daude. Ez dira beti hirurak agertzen, baina lotura konplexuak beti. Desmosometan aberatsak, fascia nahiko eta nexuak ez hainbeste.



- Erretikulu sarkoplasmatikoa muskulu ildaskatu eskeletikoan baino garapen maila gutxiagokoa

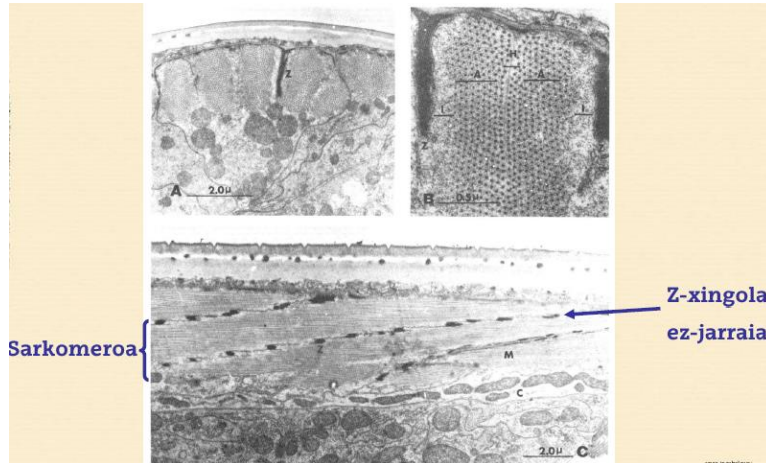
- Sarkomeroan ildaskak ez daude horren ondo antolatua, ez daude modu perfektuan eta bereiztea zailagoa
- T tubulu eta erretikulu sarkoplasmatikoaren arteko kontaktu guztiak urriak dira
- Kontaktua dagoenean diadak sortzen dira: erretikulu sarkoplasmatikoaren zisterna bat eta T tubulu bat batzean
- Erretikuluan  $Ca^{2+}$  ugari metatu, mintzaren polarizazioa estimuluengatik aldatzen bada, mintzeko puntutik sarkomera pasatu seinalea eta  $Ca^{2+}$  ponpatzen du zitoplasmara.



## 6. Muskulu ildaskatua ornogabeetan (lur zizare, molusku)

Muskulu ildaskatu oblikua (helikoidala):

- Ornogabeetan hainbat taldetan agertzen da
- Zelula mononukleatuak
- Z xingola ez-jarraiez mugaturiko sarkomeroak eratzen dituzten miozuntz lodiak eta meheak dituzte. Bata bestearekiko desplazatuta agertzen dira eta horrek xingola forma eratzen du
- Miozuntzak Z xingolekiko oblikuoak dira (zeiharra)

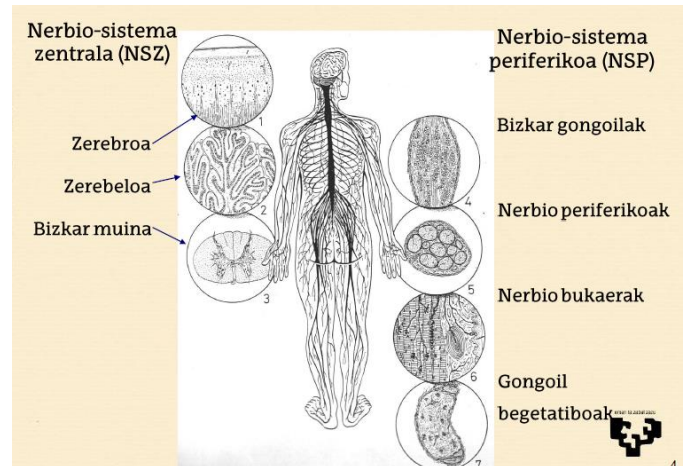


## 9. Nerbio ehuna

### 1. Egitura orokorra eta sailkapena

- Nerbio-sistema zentrala (NSZ): zerebroa, zerebeloa, bizkar muina
- Nerbio-sistema periferikoa (NSP): bizkar gongoilak, nerbio periferikoak, nerbio bukaerak, gongoil begetatiboak

Bi sistema hauek elkarrekin kontaktuan eta komunikazioan daude eten gabe, beraz, unitate bakartzat ere kontsidera ditzakegu.



#### 1.1 Zeregina:

Organismoaren atal guztien arteko koordinazioa eta ingurunearekin komunikazioa

Honetarako, nerbio ehuneko zelulek oso garatuta dituzte:

- Kitzikagarritasuna: estimulu desberdinen aurrean (fisiko/kimikoak) erantzuteko ahalmena (estimuluen harrera/erantzunaren ekoizpena)
- Eroankortasuna: erantzuna transmititzeko ahalmena (estimulu-erantzunaren transmisioa)

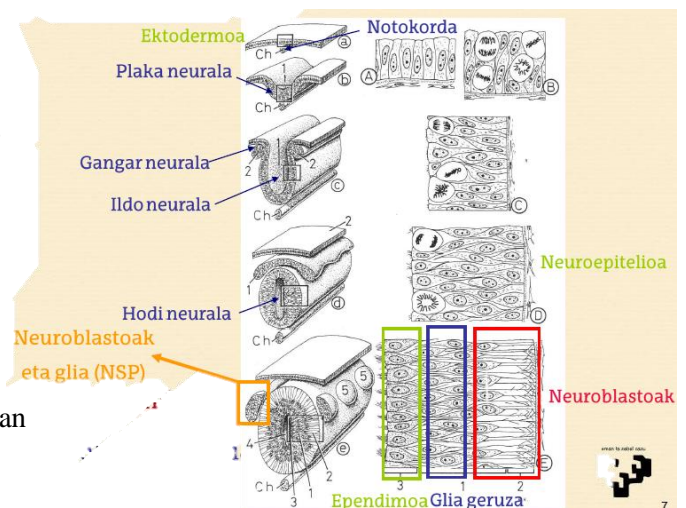
Bi zelula mota nagusi:

- **Neuronak**: estimulua jaso eta transmititu. Nerbio zelula espezifikoa. Kitzikagarriak eta eramaileak
- **Glia zelulak (neuroglia zelulak)**: neuronen euskarri estrukturala eta metabolikoa. Laguntzen agertu baina sistema bakoitzean (zentral eta periferikoan) desberdinak eta desberdin funtzionatu. Hauen bidez elikatu, egiturak berriztatu. Sistema immunearen funtzioa nerbio sistemaren barruan. Hauek dira benetan neuronak aktibo eta lanean egotea ahalbidetzen dutenak

Matrize estrazelular gutxi. Aldakorra tokiaren eta egoera metabolikoaren arabera, Oinarritzko substantzia asko eta zuntz gutxi.

### 2. Histogenesia

Jatorri **ektodermikoa**. Garapenean zehar ektodermoa, endodermoa eta mesodermoa sortzen dira. Ektodermoa zenbait aldaketa gertatzen hasten dira; zelulen migrazio bat hasten da, eta inbaginazio berezi bat sortzen da: ildo neurala. Ildo horren behealdean beste batzuk baino gehiago zatitzen diren zelulak daude, eta horiek plaka neurala sortzen dute. Momenturen batean zelula hauen zatiketak direla eta, alboko zelulak gorantz migratuko dute eta azkenean egitura itxi bat lortuko da: hodi neurala.





Gangar neuronaletik (hodiaren alboetako guneak): NSP-ko neuronak eta glia zelulak. Geruza marginaletik (kanpo geruza): NSZ-ko neuronak. Barnera begirako zelulek, matritzekoek: endimioa. Tarteko zelulek: NSZ-ko glia zelulak, astroglia, oligodendroglia.

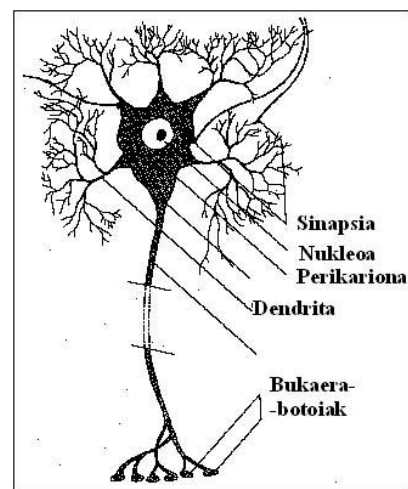
### 3. Neuronak, morfologia eta sailkapena

#### 3.1 Neuronak:

- Zelula handiak
- Komunikazioaz arduratu, zelula nagusiak
- Konplexuak: itxura oso aldakorra eta gune bereziak
- Oso adarkatuak: luzakin zitoplasmatikoak, gehienetan oso konplexuak, zitoeskeleto oso garatua.

Hiru atal:

- o **Perikariona:** nukleoa dagoen tokia eta hau inguratzen dagoen zitoplasma. Karion nukleoa da eta peri ingurua. Hemen neuronen organulu gehienak.
  - o **Dendritak:** luzakin zitoplasmatikoak, komunikaziorako. Informazioa, kinada, estimulua jaso eta perikarionera garraiatu
  - o **Axona:** luzakin zitoplasmatiko berezia. Estimulua hemen zehar garraiatzen da itu zelulara. Oso axoi luzeak egon daitezke, metro bat inguru.
- Beraz, seinaleak dendritara, perikarionetik pasatu eta gero itu zelulara heldu, kinadaren aurrean behar den erantzuna emango duena. Batzuetan seinalea perikarionetik sartu.
    - [ Dendrita + perikariona = seinaleen harrera
    - [ Perikariona + axona = transmisioa



#### Dendritak:

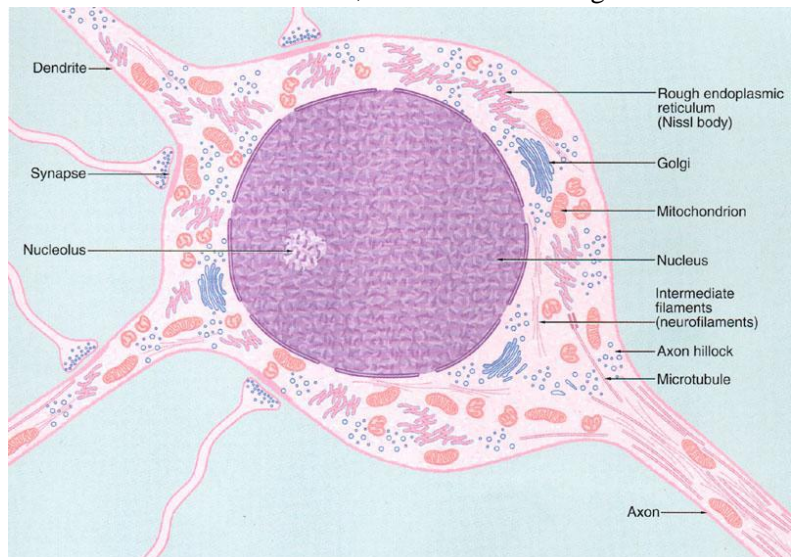
- Zelularen azalera emendatzen duten luzakin zitoplasmatikoak, estimuluak jasotzeko azalera handitu
- Neuronetan hainbat dendrita nagusi daude eta hauek adarkatzen doaz euren diametroa txikitzen doan heinean, perikarionetik aldentzen diren heinean
- Perikarionetik gertuko dendrita gunean, mitokondrioak, EEP berezia, zitoeskeleto osagaiak (mikrotubuluak). Zenbat eta urrunago, oso zitoeskeletikoa, egitura mantentzeko beharrezkoa

#### Axona:

- Bakarra, luzea eta diametro txikikoa
- Kinadak transmititzeko: Mitokondrioak (ez perikarionean beste), zitoeskeleto mikrotubuluak daude, baina ez dago EEPrik.
- **Kono axonikoa:** perikarionaren irtengune zitoplasmatikoa, axona eta perikariona batzen diren guneko egitura berezia. Ez dauka EEPrik. Axoi luzeko zeluletan oso bereizgarria. Perikariona estutuz doan gunea
- Ornodunetan **mielinazko zorroa** egon daiteke (mielinikoak, amielinikoak)
- Luzakinak edukiz gero, axonaren ardatz nagusiarekiko perpendikularrean

### Perikariona edo soma:

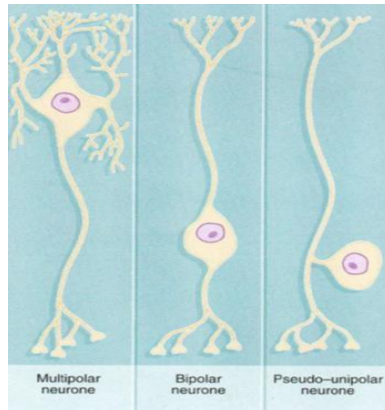
- Nukleoa: handia, zentrala, nukleoloduna. Oso nabaria. Batzuetan bi edo hiru agertu. Jarduera metabolikoa oso altua delako agertu nukleoloa
- Zitoplasma: mitokondrioetan oso aberatsak, lisosomak ere baina ez gehiegi.
- **EEPa** berezia da, erretikulu besikula bereziak agertzen dira: **Nissl-en gorputzak**. Sintetizatu proteina txikiak. Mikroskopioan itxura berezia. Erribosoma askeak, material basofilo ugaria.
- GA: nabaria. Mezulari kimikoen (neurotransmisoreen) sailkapena eta paketamendua; besikula neurojariatzaileak edo sinaptikoak eratuko dira, axonean zehar bidaiatuko dutenak ondoren kanporatzeko.
- Zitoeskeletoa: garrantzitsua baina ez dendrita eta axonetan beste. Mikrotubuluak (neurotubuluak) eta piru ertainak (neuropiruak)



### 3.2 Neurona motak:

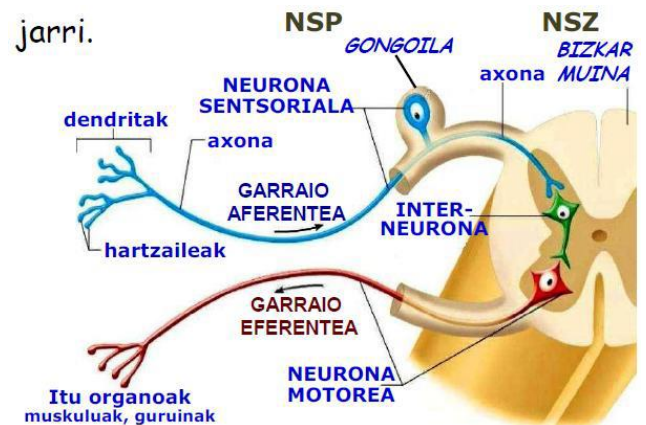
Luzakinen forma eta kopuruaren arabera sailkapena (axona eta dendritak). **Morfologiaren** arabera. Oso morfologia aldakorra.

MOTA	AXONA	DENDRITAK	EZAUGARRIAK
Unipolarrak	Bai	Ez	Garapen enbrionarioan (aurrera doan heinean, garrantzia galduz, dendritak beharrezkoak), zelula sentsoialetan (organismo helduetan)
Bipolarrak	Bai	Bat	Hartzaile sentsoialetan erlazionatuta. Ugari eta ohikoenak.
Multipolarrak	Bai	Batzuk	Itxura orokorra. Ugari eta ohikoenak.
Axongabea	Ez	Batzuk	Neuronen arteko konexio bereziak, ez ugariak
Biaxonalak	T itxura	Ez	Pseudounipolarrak: neurona bipolarretatik eratorriak. Perikariona garapenean zehar desplazatzen da eta axona eta dendrita fusionatzen dira. Estimulua perikarionetik ez da pasatzen kasu askotan. Komunikazioa azkarragoa. Beste bien ondoren ugariak.



**Funtzioaren arabera:** garraioa nondik nora

- 1) Neurona motoreak: NSZko kinada, itu edo diana zeluletara (muskulua, guruina) garraiatu
- 2) Neurona sentorialak: kinada jaso eta NSZra garraiatu
- 3) Interneuronak: NSZko neuronak. Neurona sentorialek eramandako kinada neurona motoreetara eraman, sentorialak eta motoreak harremanetan jarri



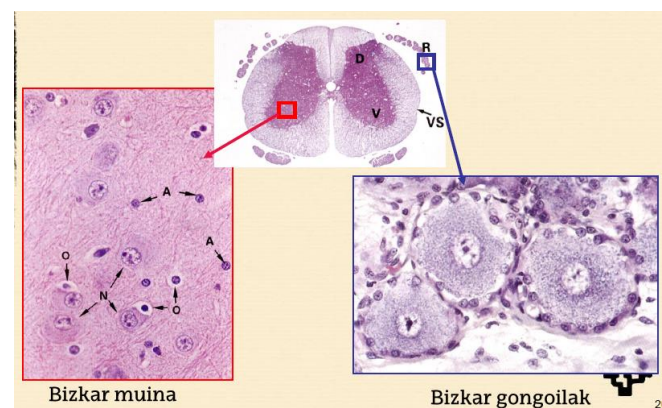
**Neurotransmisoreen arabera:** EEPn sortzen dutenaren arabera. Nissl-en gorputzetan bakoitzak neurotransmisore bat sintetizatu. Ez da esklusiboa, batek bat baino gehiago

- Kolinergikoak (azetilkolina)
- Adrenergikoak (adrenalina, noradrenalina)
- Aminoazidergikoak (GABA, Gly, Glu, Asp)
- Peptidergikoak: peptido txikiak (neurotentsina, entzefalinak)
- Bestelakoak: dopamina, serotonina, glizina...

### 3.3 Neuronen banaketa ornodunen nerbio-sisteman:

- Nerbio-sistema zentrala: entzefalo eta bizkar muina.
  - Substantzia grisa: perikarionak, dendritak eta axonen gune proximalak (kono axonikoa).
  - Substantzia zuria: axona → Mielinaz gaineztatuta dago eta honek kolore zuria duelako du izen hori.

Tximeletaren hegoak substantzia grisa. Inguruan axoiak, substantzia zuria.



- Nerbio-sistema periferikoa:
  - Gongoilak: Perikarionak eta axon eta dendriten gune proximalak
  - Nerbioak: gongoilen arteko komunikazio-axonak





presinaptikoak eta neurona postsinaptikoak jaso ondoren erantzuna eman edo neurona batetik bestera pasatuko du.

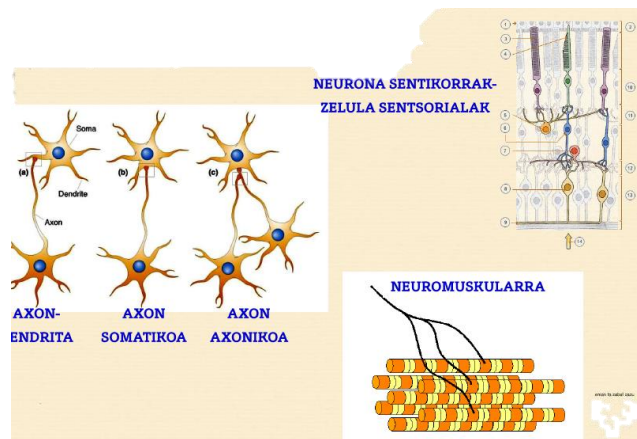
$K^+$ -ek ere parte hartzen du karga aurreko baldintzetara pasatuz.

**Elektrikoa:** neurona sinaptikoa eta postsinaptikoa fusionsinaptikoki daude, ez dago gune sinaptikorik. Seinalea axoiaren bukaerara heldu eta despolarizazio hori jarraian transmitituko dio postsinaptikoari. Ez da neurotransmisorerik garraiatu behar, ez dute parte hartzen. Batetik bestera zuzeneman seinalea eramaten.

**Mixtoa:** axoiaren bukaeraren alde bat fisikoki lotuta egongo da neurona postsinaptikoarekin eta beste aldean gune sinaptikoa sortuko da eta neurotransmisoreak beharrezkoak dira. Estimulua areagotzea beharrezkoa bada, oso erantzun bortitza ematen du: entzimen jario handia behar bada, bai energikoki eta bai neurotransmisoreen bidez garraiatuko da seinalea.

### 3) Kokapen eta egituraren arabera:

- Neuronen artekoak:
  - Axon-dendrita
  - Axon-perikariona (soma)
  - Axon-axon: ez da zelularekin zuzenean lotzen, axoiarekin lotzen da.
- Neuromuskularra: neurona eta muskulu artean
- Neurona sentikorren eta zelula sentorialen artekoak
- Nerbio bukaera eta zelula sentikorren artekoak (guruin-zelula endo eta exokrinoak, gantz-zelulak)



## 5. Neuroglia

Neuroglia edo glia: neuronekin azaltzen diren zelulak nerbio-sistema **zentralean** eta **periferikoan**. Neurona funtzionalak izateko eta beren betebeharrak egiteko ezinbestekoak, ondo funtzionatzeari ahalbidetu.

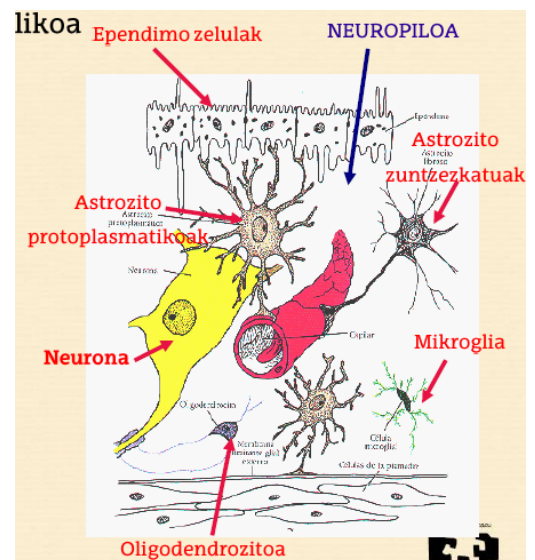
Neuropiloa: Neuronen parikarionak inguratzen dituen dendrita-axoi eta neuroglia sarea /euskarria

## 5.1 Sailkapena

- 1) Nerbio sistema zentraleko glia:
  - Epiteliala (ependimoko zelulak) → epitelio kubikoa, hodi neuralaren alde apikalean, matritetik desberdintzatu
  - Interstiziala (nahiko txikiak)
    - Astrozitoak: protoplasmatikoak (sustantzia grisean), zuntzekatuak (sustantzia zurian) eta hegalatuak. Nukleo zentrala eta luzakin asko eta konplexuak. Oso espezializatuak.
    - Oligodendrozitoak
    - Mikroglia: Hortege zelulak edo mesoglia (mesodermotik)
- 2) Nerbio-zuntzetako eta sistema periferikoko glia
  - Schwann zelulak: oligodendrozitoen parekoak
  - Zelula sateliteak

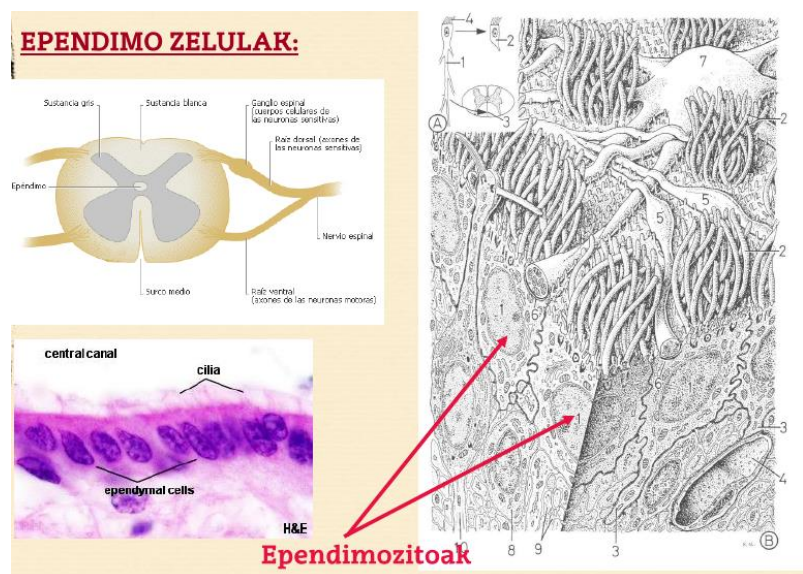
## 5.2 Funtzioa:

- Sostengu fisikoa eta metabolikoa eskaini neuronei, elikagaiak helarazi, hondakinak askatu, ME egoki bat eman neuronei funtzioa bete, axoia hazi...
- Babesa eta orbainketa (zikatrizazioa): patogeno edo zaurien aurrean erantzuna edo aurre egingo diote. Ez dira zuzenean sistema immunekoak baina seinaleak jariatzen dituzte sistema immuneko zelulak bertara joateko. Kalteak daudenean konpontzeko funtzioa
- Mielinaren sintesia: mielinazko zorroa. Oso zelula adarkatu eta konplexuak, luzakin zitoplasmatiko piloa, oso adarkatuak. Zelula txikiak tamainaz
  - NSZean: Oligodendrozitoak
  - NSPan: Schwann zelulak
- Fagozitosia



### 5.3 EPITELIALA: Ependimo zelulak

- Ornodunen NSZean daude.
- Zerebro eta bizkar muineko (NSZ) barrunbeak gaineztatzen dituzte.
- Jatorri ontogenikoa → ektodermikoa
- Eitelio kubikoa eratzen dute, zelulak **desmosoma** eta **nexuen** bidez loturik daude
- Nerbio ehuna gaineztatu, mugatu
- Zelulen luzakin basal luzeek xafra basala zeharkatzen dute eta nerbio-sistemako beste eskualdeetara hedatzen dira
- Zilioak eta mikrobiloskak dituzte, batzuetan tolesdura basalak agertu. Hauen kopurua eta konplexutasuna



Normalean bakuna, irudian geruzatua.

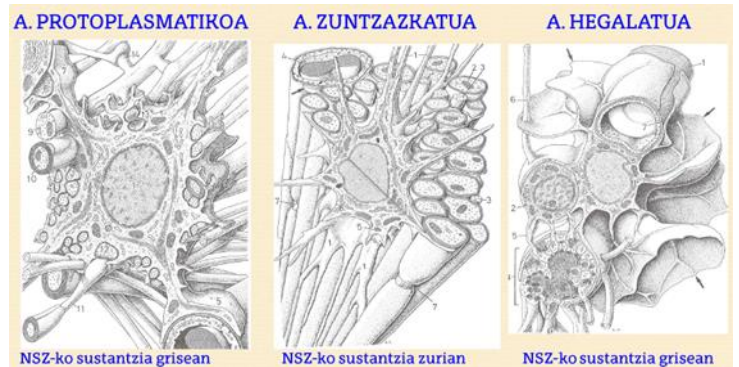


jarduera metabolikoen arabera aldatzen da.

- Garraio-epitelioa: likido zefalorrakideoaren (entzefaloari eta bizkarrezur muinari dagokiona) konposizioa eta NSZko ingurunea eraentzen dute → nerbio ehunetik bestelako ehunetara substantzien/hondakinen garraioa kontrolatu

#### 5.4 INTERSTIZIALA: Astrozitoak

- Luzakin zitoplasmatiko ugari eta luzeko zelula handiak, izar itxurakoak. Hauen bidez, neuronak kapilareekin konektatzen dituzte (elikagaien trukea kontrolatzen dute).
- Nukleo zentrala.
- Neuronen arteko matrize estrazelularren gehiengoa betetzen dute, substantzia grisean batez ere.
- Glia-mintz mugatzaile peribaskularra: kapilareen %80 gaineztatzen dute.
- Neuronen sostengu estrukturala eta funtzionala: beraien egitura mantendu eta elikagai, oxigeno eta hondakinen kudeaketa.

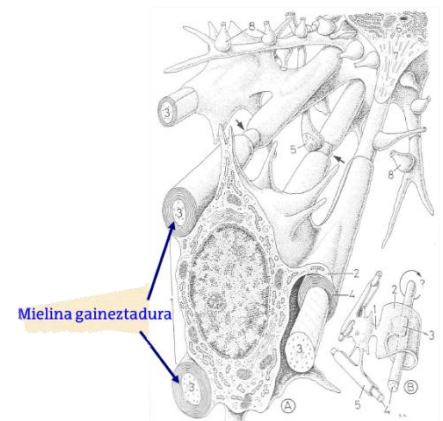


#### Motak:

- Protoplasmatikoak: zerebro eta bizkar muineko substantzia grisean.
- Zuntzekatua: NSZeko substantzia zurian, orbainketan hartzen dute parte
- Hegalatuak: zerebeloaren geruza pikortsuan agertu, kokapen eksklusiboa. Luzakin hegalatuek neuronak eta kapilareak gaineztatzen dituzte

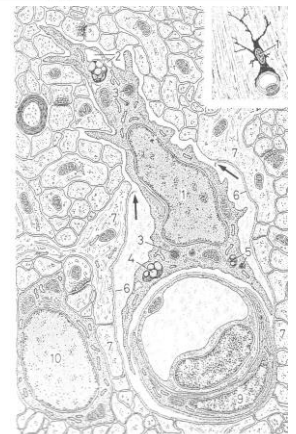
#### 5.5 INTERSTIZIALA: Oligodendrozitoak

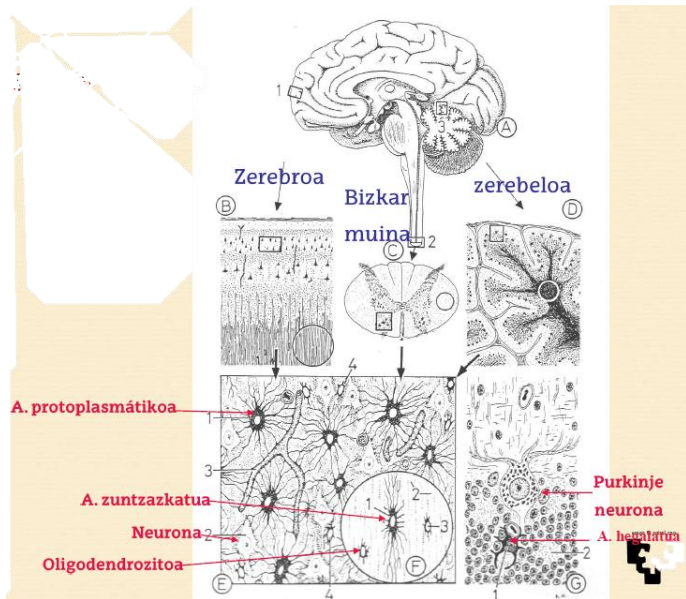
- Zelula txikiak, luzakin zitoplasmatiko urriekin.
- Glia zelularik **ugariena**.
- Erlazio zuzena neuronekin.
- EEP eta GA oso garatuak.
- Mielina-gaineztadura sortzen dute NSZean → axonak batzuetan gaineztadura hau du, honen bidez bulkadak azkarrago garraiatu, isolatzaile elektrikoa...



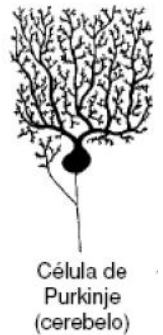
#### 5.6 INTERSTIZIALA: Mikroglia

- **Mesoglia** eta **Hortega** zelulak → zelula mota bat baino gehiago dagoela uste da baina ez dira ezagutzen
- Zelula txikiak eta urriak beste biek (astrozito eta oligodendrozitoak) alderatuz
- Luzakin zitoplasmatikoak
- EEP, GA eta lisosomak
- Ahalmen fagozitikoa: NS-ko makrofagoak
- Kapilareetatik hurbil
- Mugimendu ameboidea
- Jatorri mesodermikoa





**Purkinje neurona/zelula:** zerebeloan agertu, dendrita oso konplexuak. Oso erraldoiak. Geruza molekular eta pikortsuaren artean kokatu.

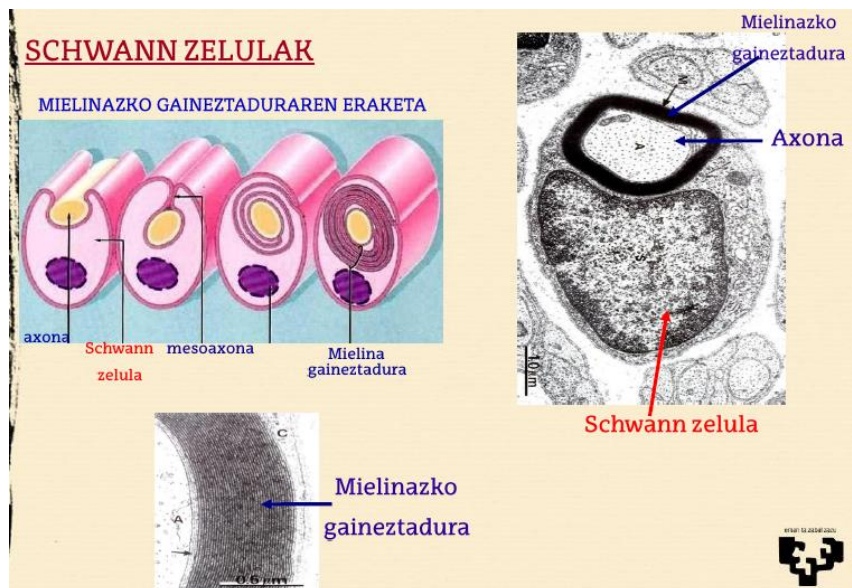


## 6. Glia periferikoa

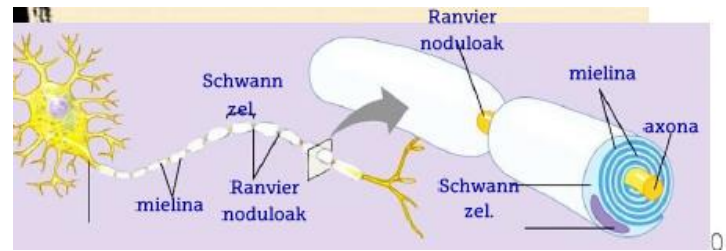
### 6.1 Schwann zelulak

- Axonei laguntzen diete NSPan
- Mielina-gaineztadura sortzen dute NSPan axona periferikoen inguruan → oligodendrozitoen parekoak

Neurona inguratzen dute, axonaren zitoplasmaren inguruan kokatu (barruko pikorrak mikrotubuluak). Orduan erdilipidikoa den mielina jariatzen hasten dira. Honek babes mekanikoa eskaini eta bulkadak azkarrago garraiatu.



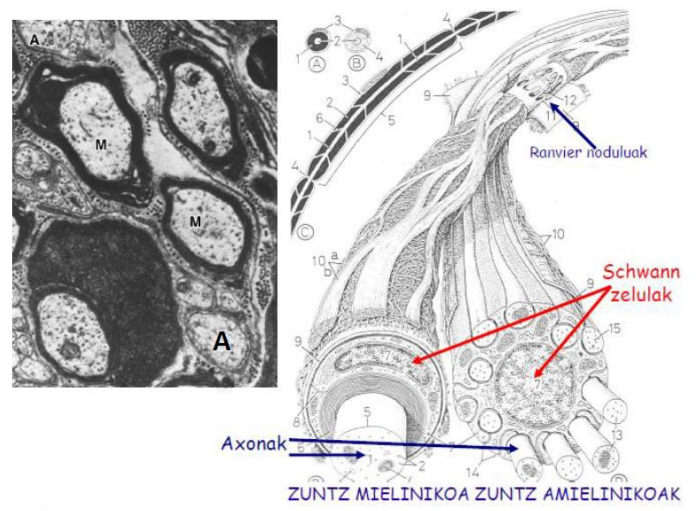
**Nerbio bulkadak:** Schwann zelulek axonen sekzio bat bakarrik inguratzen dute. Bi zelularen artean, **Ranvier noduluak** daude. Bertan kokatzen dira  $Na^+/K^+$  kanalak. Bulkada ez da axonaren azalera osoan joango, saltoka doa nodulu batetik bestera. Horregatik, mielina badago seinalea azkarrago garraiatzen da, ingurunearekin kontaktuan dauden zati horietatik bakarri pasatzen delako.



- Xafla basala eta erretikulinazko zuntzak (egitura mantendu) aurkeztzen dituzte (ehun konektiboa): axonen inguruan eratzen duten epitelioan agertu

Metabolikoki ez dira zelula aktiboak, mielinak egiten du funtzio hori:

- Zuntz mielinikoak: Eroale azkarrak dira, 1-20µm-ko diametroa dute eta 1 metroko luzerara heltzen dira. Schwann zelulek gaineztatzen dituzte (mielinaz).
- Zuntz amielinikoak: Axon aldea Schwann zelula batez gaineztatuta (soilik euskarria eskaini)



## 6.2 Zelula satelliteak

Gongoiletan kokatzen dira, perikarionen inguruan, gune metabolikoki aktiboa. Isolaketa elektrikoa eskaintzen dute. Funtzio nagusia metabolikoki hainbat substantzien garraioa egin nerbio sistema periferikoan zehar.

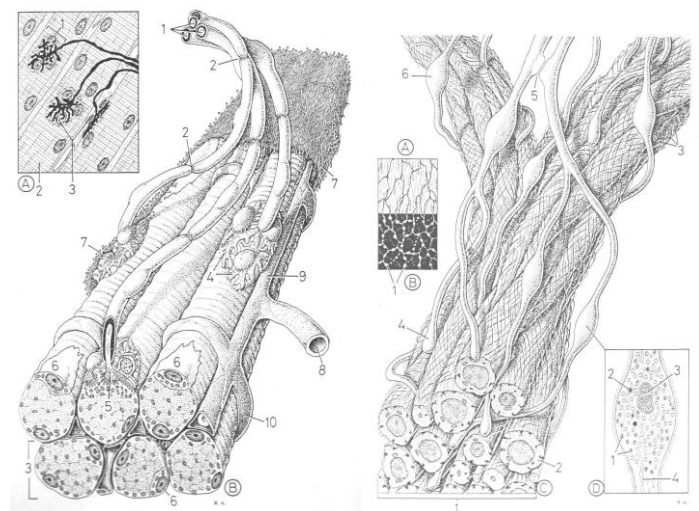
## 7. Nerbio bukaerak

Noraino heltzen den edo bere funtzioaren arabera espezializazio desberdinak

### 7.1 Nerbio bukaera eferentea:

Plaka motorea: Nerbio-zuntza adarkatzen da muskulu zuntz eskeletikoen gainean → neurona eta muskulu ildaskatuaren artean sortu, hauen konexioaren ondorioz (perikarionen arteko kontaktuan ez da behar horrelako egiturarik)

- Axona bukaera aldean ikaragarri **adarkatuta** agertzen da, hainbat luzakin (3-4) desberdin atera. Muskulu ildaskatua (itu zelula) oso aktiboa denez, kontaktu eremu



Plaka motorea eta begetatiboa



handiagoa behar da, batez ere erantzun azkarra eman behar denean eta neurotransmisore ugari jariatzen dira.

- Neurotransmisorea: azetilkolina

#### Begetatiboa:

- Muskulu leunean
- Nerbio-zuntzek mielina-gaineztadura galtzen dute muskulu leuneko zuntzetara heltzean
- Ez dago plaka motorerik, axonaren amaieran ez dago adarkadura edo egitura konplexurik, askoz geldoagoa delako

### 7.2 Nerbio bukaera aferenteak:

- Kanpoko informazioa jaso eta transmititzen dute (hotza, mina, presioa) → zelula sentikorretatik seinaleak eramane NSZra
- Seinale batzuk oso konplexuak, mota ugari
- Nerbio bukaera aske bezala edo zelula espezializatuak inerbatzen (nerbio batek gorputzaren alde bat nerbio kinadaz hornitu) → zelula sentesorialen arabera bukaera desberdinak
- Nerbio-zuntzek epitelioko xafila basalera heltzean mielina-gaineztadura galtzen dute
- Nerbio-zuntzen xafila basala eta epiteliorena jarraiak dira

## 8. Berreraketa

Neuronak ezin dira bikoiztu (zatitu daitezke baina oso kopuru txikietan, egoera berezietan → neurona hiltzean gune berezian gertatzen bada, berreskuratu daiteke), baina luzakinak birsortu daitezke perikarionaren sintesi ahalmenaren arabera

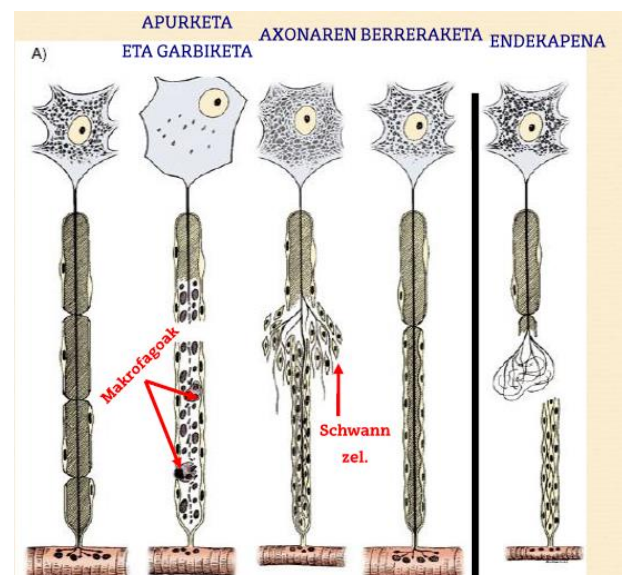
- Axonaren zati bat galtzen bada, birsortu daiteke Schwann zelulak eta mielina-gaineztadura geratzen badira.

NSPn, inguruko zelula sateliteen bidez konpondu daiteke, mielinazko zorro berria, axon berria... eratuz. Nahiko sekuentzia tipikoa:

- 1) Axona apurtu eta berreskuratzeko, makrofagoen migrazioa eman. Hauek hor geratu diren axonaren arrastoak fagozitatzen dituzte, birziklatu beharrekoak. Oraindik bizirik dagoen neuronak mikrotubuluak eta mintz berria sortuko ditu. Axona luzatuz joango da pixkanaka.
- 2) Aldi berean, Schwann zelulek zatitzeko ahalmena dutenez, zatitu eta, behien garbituta dagoenean, kaltetutako gunera migratzen dute. Hauek bideratu axonaren hazkundera sinapsia berreskuratu arte
- 3) Glia zelulek ere zatitzeko ahalmena dute, baina mugatua da.

Helduetan, **zelula ama neuralak** topatu dira: bikoizteko eta migratzeko ahalmena duten zelulak.

**\*Endekapena:** Axona apurtuta dago, mintz berria, mikrotubuluak baditu baina apurtuta dago eta ez du aurkitzen bere beste ertz funtzionala. Orduan, ertz hori hil egingo da eta konexio hori galduko da. Goian gelditu den neurona zati horrek ezin dio inori seinalea eman eta makrofagoek liserituko dute zati ez-funtzional hori.



# 10. Landare ehunak

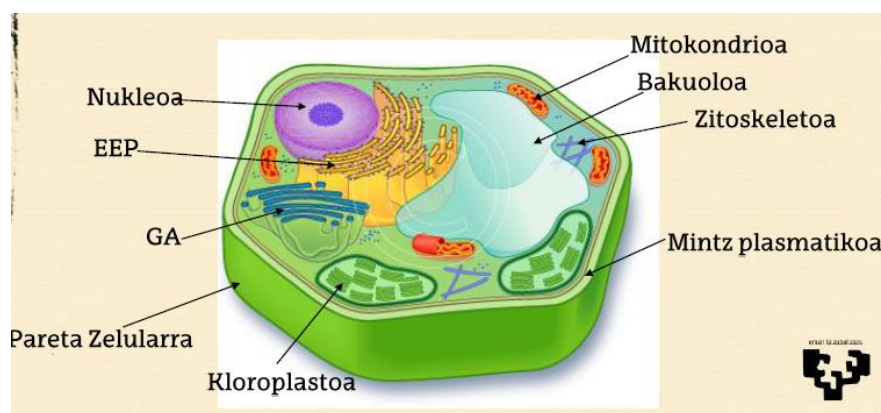
## 1. Sarrera

Landareak modu berezietan antolatu, ehunak baino sistemak eratzen dituzte.

Landareek kontutan hartu beharreko bi berezitasun nagusi dituzte:

- Landare-zelulek pareta zelularra dute mintz plasmolikoaren inguruan. Zelulosazkoa, zelulosa + kitina, landare zeluletan garrantzitsua → oso egitura geometrikoa osatu, zurruntasuna eta egitura eman landareari
- Enbrioi fasetik hasita, landareak meristemo deitzen den egitura zelular batetik hasita hazten dira. Bertan zatiketa zelularrak gertatzen dira; bertan dauden zelula berezi batzuk zatitzen hasten dira eta zelula berriak ematen dituzte. Zelula hauek **totipotenteak** dira. Hauek helduz doazen heinean desberdintzatuz.

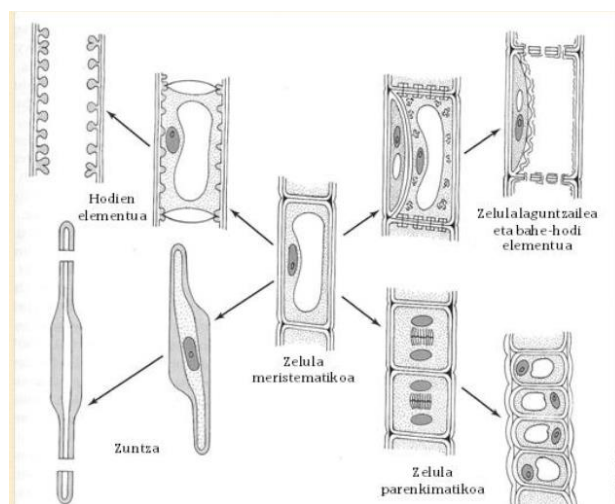
Landareen berezitasun nagusia kloroplastoak dira, organulu bereziak dira, fotosintesia burutu, oxigenoa askatu... Landare zeluletan beste osagaiak ez dira oso desberdinak animaliekiko. Lisosomak ez oso bereziak. Landare mota batzuetan bakuolo erraldoia erdian baina ez beti.



## 2. Meristemoak

Landareek jatorria sistema meristematikoan dute. Zigoto edo hazi batetik osatzen dira, hau zatitzen, zelula gehiago sortzen, desberdintzapen prozesuak eman eta zelula desberdinak sortzen doa. Landareen hazkuntza eta zatiketa zelularra egiten dutenak zelula meristematikoak dira.

Meristemoak landareen etengabeko hazkuntzaren arduradunak (bizitza osoan zehar aktiboak) dira eta landareen bizitza osoan zehar agertzen dira. Meristemoko zelulak totipotenteak, normalean pluripotenteak, dira eta sailkapena beraien kokapenaren arabera egiten da.



Primarioa: luzerako hazkuntzaren arduradunak

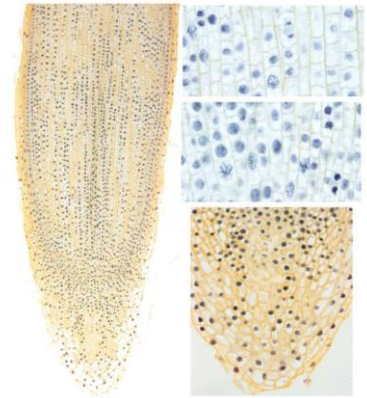
- **Meristemo apikalak:** Garrantzitsuena. Zurtoin, adar (guztiak) eta sustraien (nagusiak) ertzetan kokatzen dira. Zelula horiek zatitzen eta desberdintzatzen doaz. Meristemo bakoitzean **protodermisa** (landareen epidermisa emango duena), **protocambium**-a (sistema

baskularrak emango dituen) eta **meristemo fundamentala** (oinarrizko sistema eman) topatzen ditugu.

- **Meristemo interkalarrak:** tarteka kokatzen dira ehun ez-meristematikoaren artean. Ez dira landare guztietan agertzen. Adarren zenbait puntutan edo zutoinetan agertzen dira, apikalei hazkuntza efizienteago izaten laguntzen diete. Zuhaitz tropikaletan oso garatuta, oso azkar hazi behar direlako argia lortzeko eta oso aktiboak direlako.

Sekundarioa: Zabalerazko hazkuntzaren arduradunak. Hazkuntza sekundarioa. Zelula meristematiko sekundarioak meristemo apikaletik eratorria dira. Oso desberdintzapen maila baxua dute, eta ez dira zelula amak.

Meristemo apikala

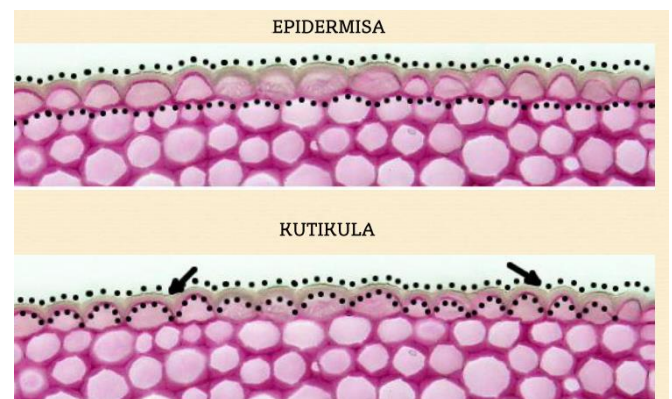


### 3. Sistema dermiko

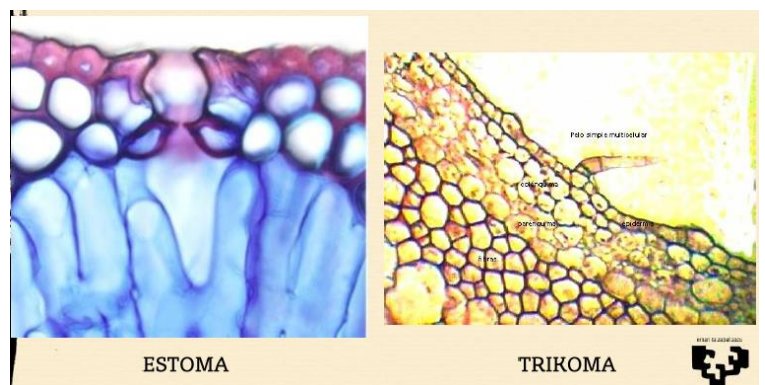
Landareren kanpo muga markatzen dute eta kanpo medioarekin kontaktuan daude. Hiru ehun mota agertzen dira sistema honetan: epidermisa, ehun jariatzaileak eta peridermoa

#### 3.1 Epidermisa

- Bere jatorria meristemo apikaleko kanpoko geruzan dago (protodermisa): Zelula meristematikoak zatitzen joango dira eta barruko zelulak migratzen eta desberdintzatzen hasiko dira. Hortik **protodermisa** sortuko da. Oraindik ertzetara migratu ez duen epidermisa izango da hau, hau da, oraindik garatu gabeko zelulez osatuta dagoena.
- Estuki loturik dauden zelulen geruza bakarrez osaturik dago (kasu gutxi batzutan gehiago) → batzuetan zelula guztiz fusionatuta edo zelulen artean ME oso gutxi
- Kutina deitzen den substantzia lipidikoa jariatzen dute kutikula sortuz



Epidermiseko zelula batzuk, oraindik ere gehiago espezializatzen dira, eta beste egitura espezializatu batzuk eratzen dituzte: **estomak** (landareak ura galdu ez dezan arduratzen dira, eta fotosintesiko partaiderik garrantsitsuenetarikoa dira, oxigenoaren elkartrukean parte hartu) eta **trikomak** (babes eta xurgapen funtzioa dute, epidermiseko luzakin zelular anitzak: ura kondentsatu, babestu, pozoia metatu...).



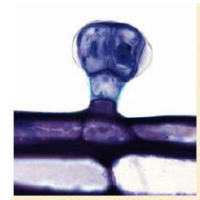
Estoma: ganbara berezi bat dute, hainbat zelula. Kutikula galdu edo dentsitatea txikitu eta oxigenoa sartu.

#### 3.2 Ehun jaritzaileak:

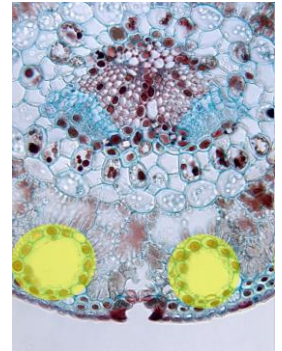
- Landareak metabolikoki oso aktiboak
- Landareetan hainbat ehun jariatzaile aurkitu ditzakegu: zelula protodermikoak migratzen doazen heinean, hauek sortzen



- Organismoaren kanpo aldera jariatzen duten organoak jatorriaz epidermikoak dira eta zelulen proliferazioz zein desberdintzapenez sortzen dira. Jariatzen dituzten substantziak protodermisean sortu eta dermisean heltzen dira → **Hidratodoak** (ura), **nektarioak** (nektarra), **osmoforoak** (toxikoak), **guruin trikomak**
- Organismoaren barne aldera jaritzen dutenak, jatorri parenkimatikoak dute. Barne mediora jariatzean, jatorria protodermisa da, baina migratu ahala, epidermiseko zelula bezala desberdintzatu beharrean, epidermiseko ehun jariatzaile bihurtu eta, behar bada, guruin jariatzaile bihurtuko dira. Hala ere, desberdintzapen hau geldituzen da, zelulak hurrengo zelula geruzarekin, protocambium-arekin, fusionatuko dira eta hauekin batera desberdintzapen sekundarioa eta definitiboa → **Idioblastoak** (denetarik), **hodi resiniferoak** (erretxina), **hodi latiziferoak** (latexa), **barrunbe lisogenikoak**



GURUIN TRIKOMA



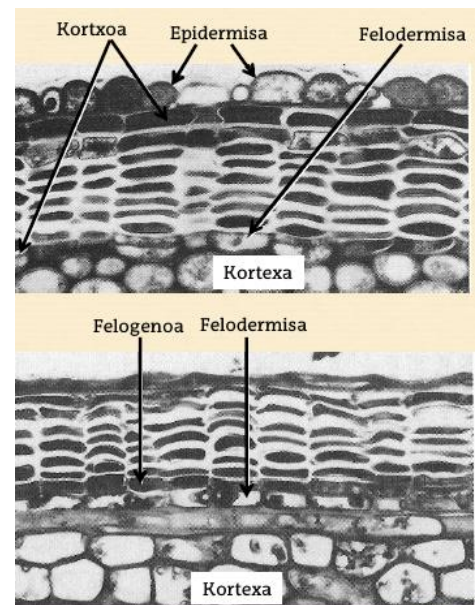
Hodi resiniferoa

Erdikoak zelula mesenkimatikoak izango dira, ingurukoak protodermisa eta erdikoak protokambiuma.

### 3.3 Peridermoa:

Hazkuntza sekundarioa agertzen den sustrai eta zurtoinen ataletan agertzen da, zuhaitz handietan, eta bere sorrera felogenoaren jardura dela eta gertatzen da. Felogenoa zelula biziz osatutako geruza da, protodermisean du jatorria. Hauek zelulosa sintetizatzen dute, oso kantitate handietan.

Kanpora migratzen duten zelulak ugariagoak dira, suberifikatzen dira, zelulosa piloa metatu, hil eta suberra edo kortxoak eraten dute, geruza iragazgaitz oso lodia. Barnealdean geratzen diren zelulak bizirik daude, metatzen dira eta felodermisa osatzen dute. Oso egitura garatuetan lignina sintetizatzen da egitura eusteko.



## 4. Oinarrizko sistema

Oinarrizko sistema parenkima, kolenkima eta esklerenkimak osatzen dute.

### 4.1 Parenkima:

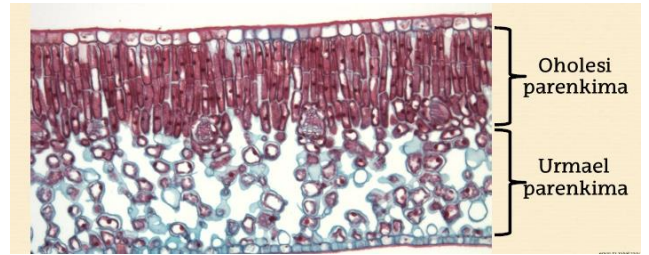
Parenkimako zelulen jatorria meristemoan dauden zelulak dira, baina desberdintzatu gabe daude. Hainbat funtzio betetzen dituzte:

- Fotosintesia
- Elikagaien metaketa
- Ehunen berriztapena

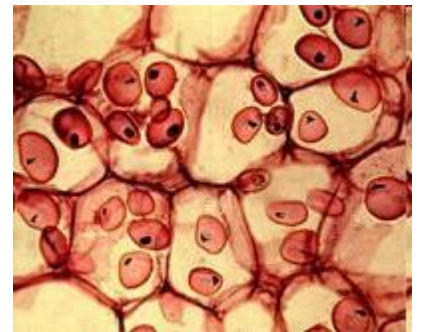
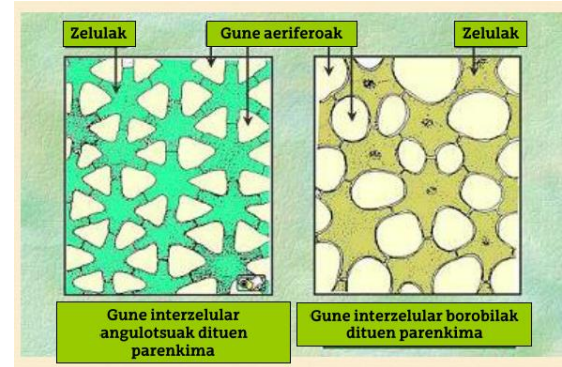
Jardueraren arabera lau parenkima mota desberdintzen ditugu:

- Parenkima klorofilikoa: nagusiki funtzio fotosintetiko du eta kloroplasto ugari ditu. Hostoetan dago. Epidermisa agertu bai goian bai behean. Bi modutan antolatuta:

- Oholesi parenkima: kloroplastoak dituzten zelulak, horietan fotosintesia egin.
- Urmael parenkima: airea edo ura errefrigerazio sistema bat bezala. Hostoa gehiegi ez berotzeko eta sistema ez kolapsatzeko beharrekoa. Aire modu askean mugitu barnean, babes termikoa eskaini.



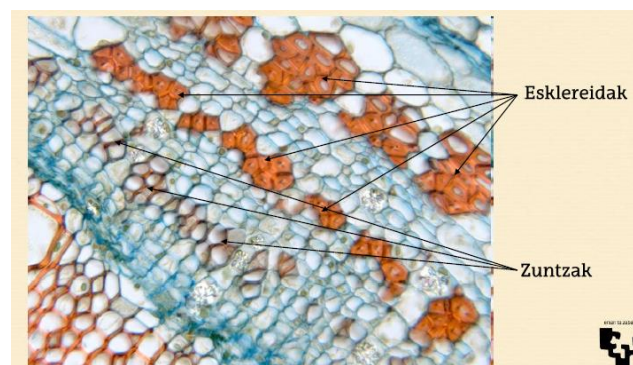
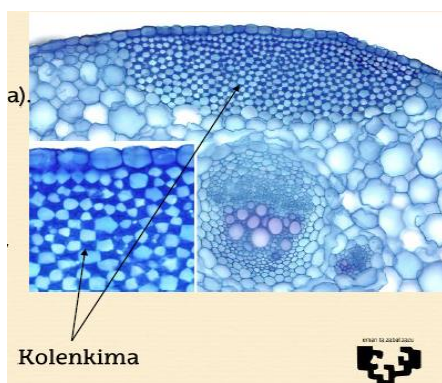
- Parenkima aeriferoa: zelulek elkarren artean komunikaturik dauden hutsuneak erakusten dituzte. Bertatik airea modu askean mugitzen da. zelulek beraien artean airea pasatu. Honen funtzioa, landareen tenperatura erregulatzea dela uste da.
- Erreserba parenkima: almidoia, proteinen kristalak, lipidoak... ekoiztu eta metatzten dituzten zelulak dituzte, erreserba materialak. Landare osoan zehar daude. Sortutako substantzia xilema eta floema bidez garraiatu gorputz osoan. Gehienetan ertzetan agertzen dira. Landare batetik bestera aldatu.
- Parenkima akuiferoa: bakuolo erraldoi bat dute, bertan ura metatzeko. Garrantzitsua landareen eta hauen metabolismoaren arabera. Kaktusek asko, tropikokoek ez.



## 4.2 Kolenkima eta esklerenkima

Landareari sostengua ematen dioten ehunak dira.

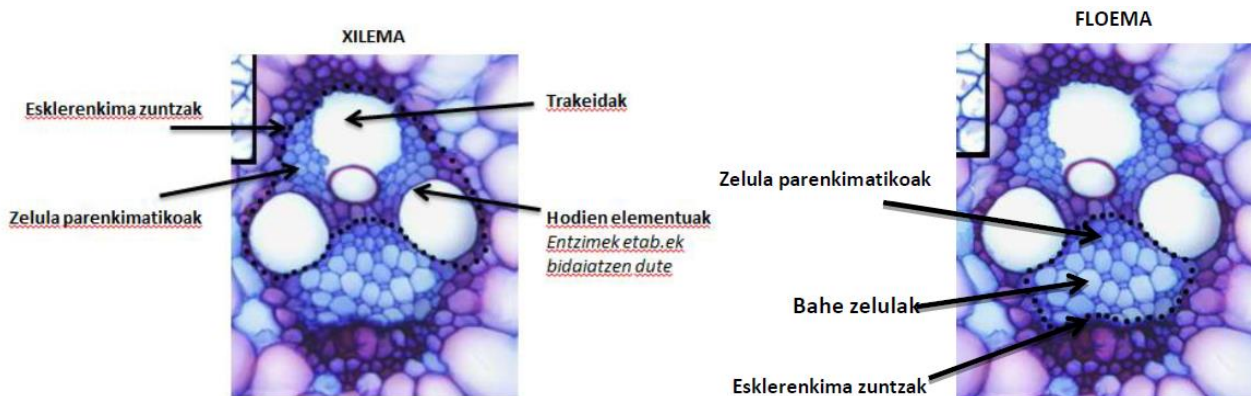
- Kolenkima: zelula mota bakarrez osaturik dago (zelula kolenkimatikoak). Zelula kolenkimatikoak pareta zelular indartsua dute (zelulosa, pektina (sustraietan) eta hemizelulosaz osaturik), adinaren arabera konposizioz alda daitekeena, eta kolenkima mota desberdinak pareta zelularraren egituraren arabera sailkatzen dira. Metabolikoki oso zelula geldoa eta estrukturalki oso sendoa.
- Esklerenkima: bi zelula mota ditugu, zuntzak eta esklereidak. Zelula hauek kasu askotan pareta oso lodia dute eta lignifikaturik agertzen da, zelula hilak. Ligninaren funtzioa babesa da.



## 5. Sistema baskularra

Landareen sistema baskularrean 2 ehun mota desberdintzatzen dira: xilema eta floema. Bi ehun hauen jatorria protocambium-a da.

- Xilema: 4 zelula mota agertzen dira: **trakeidak**, **hodian elementuak**, **zelula parenkimatikoak** eta **esklerenkima zuntzak**. Trakeidak eta hodi elementuak dira zelula nagusiak. Landareen garraio sistemaren parte da. Hau trakeiden bitartez egiten da, baina tartekatuta oinarritzko sistemaren zenbait zelula. Ez dira xilemaren zelula bereizgarriak baina agertu.
- Floema: Hainbat zelula motez osaturik dago, baina nagusienak: **bahe zelulak**, **zelula parenkimatikoak** eta **esklerenkima zuntzak** (azken biak oinarritzko sistemako zelulak).



**Irudia** artoa. Floemaren zelula handiak bahe zelulak dira eta inguruko zelula txikiak dira oinarritzko sistemako zelula laguntzaileak. Egitura mantentzen dute. Xilemaren argazkian, hodi elementuak ez agetu baina bai trakeidak, handiak. Gerta liteke, xilemako trakeida bat hasieran bai izatea trakeida baina ondoren beste batzuk sortu dira, eta hau hutsik eta lignifikatuta gelditu da hortik soilik airea pasatzen delarik. (Horregatik gorengoan ez dago pareta besteetan bezain markatuta)



# 11. Animalia Zelulen Hazkuntzak

## 1. Historia

Zelulen hazkuntza benetan XX. mendean hasi bazen ere, XIX. mendean du jatorria. Urte hauetan, zientzialari batzuk gai izan ziren organismo batetik zelulak askatu eta horiek aztertzeke.

10. hamarkadatik ikerketekin. Garai hartan Fleming-ek penizilina aurkitu zuen. Hazkuntzetan behar diren substantziak: medio aberatsa, antibiotikoak... ezagutzen hasi ziren.

- **1885.**- Roux – oiloaren enbrioia (gatz soluzioa)
- **1907.**- Harrison – anfibioen bizkairmuin enbrionarioa
- **1910.**- Burrows & Carrel – Oiloaren plasma (esplanteak)
- **1916.**- Roux & Jones – Tripsina (disoziazioa)
- **1940ak.**- Antibiotikoak
- **1948.**- Earl – lerro zelularra
- **1952.**- Gey – lerro zelular jarraia → HeLa zelulak eskuratu eta ondo hazten zirela aztertu
- **1955.**- Eagle – medio definituen garapena
- **1961.**- Hayflick – giza zelula normalen hazkuntza mugak → adin telomerikoa
- **1961.**- Ephrussi – zelulen arteko fusioa
- **1965.**- Ham – suerorik gabeko medioa
- **1975.**- Koehlr & Milstein – antigorputz monoklonalak
- **1976.**- Sato – kultiboen behar hormonalak
- **1980a.**- Gene adierazpenen eraenketa/ Espezializatutako lerro zelularrak
- **1998.**- Aigner – ehunen ingenieritza

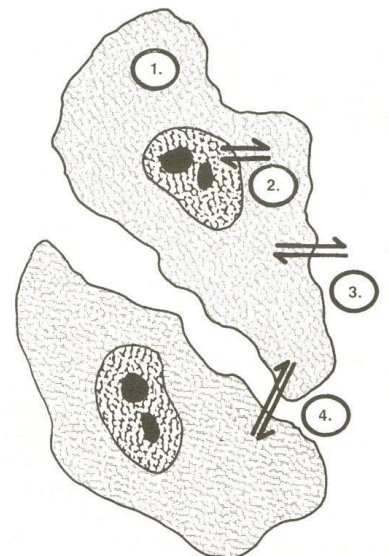
## 2. Orokortasunak

Zelulen jokaeren ikerketarako metodoa. Hazkuntza zelular batean, zelulak petri kutxa edo hazkuntza ontzi batean daude eta zelulen barnean zer gertatzen den kontrola daiteke. Baldintza zehatz eta ezagun batzuetan mantentzen dira: oxigenoa kontaktu zehatza... Baldintza oso kontrolatuak.

Gainera, zelula eta kanpo medioaren arteko elkarreragina ere aztertu daiteke, zerbait kendu edo gehitzean agertzen diren aldaketak, adibidez.

Zelulen arteko interakzioak ere aztertu, ukiten daudenean, urrun daudenean... Matritzearekiko elkarrekintzak. Oso modu kontrolatuan aztertu daitezke.

- 1) Zelulen barneko jardura: DNAren transkripzioa, proteinen sintesia
- 2) Zelulen barneko fluxua: RNA, hormonak...
- 3) Ekologia: infekzioak, drogak (farmakoak), populazioen zinetika, mintz fluxua...
- 4) Zelula-zelula interakzioak: ea elkarren artean ukitzen edo elkarrengandik urrun daudenean ze desberdintasun agertzen diren, enbrioien indukzioa, kooperazio metabolikoa, kontaktu inhibizio/dentsitatea, hazkuntza muga...



### 3. Abantailak eta desabantailak

#### 3.1 Abantailak:

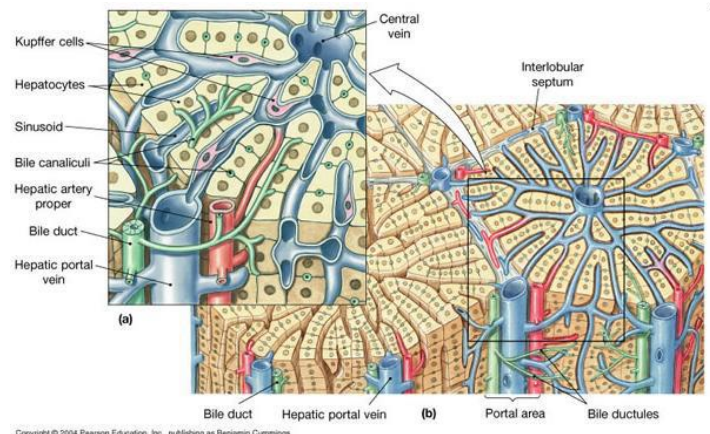
- Zelulen ingurunearen kontrol zehatza (medio definituak): badakit ze zelula ditudan; lerro zelular bera bada, zelula denak berdinak dira eta, tenperatura zehatz bat definitzen badut, zelula denek berdin erantzungo dute. Hau gertatzen ez bada jakin ahal da zer gertatu den. Baldintzak aldatu: fisiko-kimikoak (pH, T, presio osmotikoa, oxigenoa, CO<sub>2</sub>...) edo fisiologikoak (hormonak, hazkuntza faktoreak, dentsitatea).
- Laginaren homogenizitatea eta ezaugarri ezagunak: Zelulak oso kopuru altuetan ditugu eta normalean oso homogeneoak edo behintzat uniformeak izaten dira. Gaur egun, batzuetan hainbat zelula mota batera hazi, baina normalean denek jatorri bera. Beraz, beraien erantzuna uniformea izatea esperoko da. Eta horrek asko errazten du ikertzaile baten lana.
- Ekonomia: aurrezten da. Erreaktiboa, kontzentrazioak kantitate txikietan behar dira, oso ingurune txikia delako, ez dute substantzia asko behar mantentzeko.
- Etikoak: animaliak gutxi edo ezerez. Bere zelulak erabili baina ez organismo osoak. Animalia beretik zelula desberdinak eskuratu daitezke (birziklapena).

#### 3.2 Desabantailak:

- Sentikortasuna: zelulak eroso egon behar dira eta beren funtzioak ondo betetzeko, elikagai zehatzak (plasmaren antzekoa), oxigeno nahikoa, hondakinak ondo kanporatzea... beharko dute. Ezaugarri hauek beste zelula batzuentzat ere faboragarriak dira: onddoak, legamiak, bakterioak eta mikoplasma. Hauek gure zelulak baino metabolikoki aktiboagoak direnez, elikagaiak gehiago gastatu... Eta azkenean nire zelulak hil. Horregatik zelulak baldintza garbi edo aseptikoetan mantendu behar dira eta hau oso zaila da. Kutsatzen denean ez dago atzera egiterik.
- Esperientzia eta gaitasuna:
- Kostea: zelula hazkuntzan egun bateko 1g ekoizteko → animalietan baino 10 aldiz kostu handiagoa. Ekonomikoa den arren, asepsia egoera mantentzeko beharrezkoa den tresneria guztia mantendu behar da eta horrek kostu handia suposatzen du.
- Desegonkortasuna: lerro zelular jarrai batekin lanean ari bagara, horiek minbizi zelulak dira eta beraien dotazio kromosomikoa ez da normala. Nahi gabe, DNA pila bat aldiz kopiaitzen dute baten egin beharrean eta, horren ondorioz, aneuploidiak agertzen dira. Beren adierazpen genetikoan arazoak erakusten dituzte eta normalean hil egiten dira.

Zeluletan ikusten den erantzuna, animalia barnean benetan gertatzen denarekin; hots, errealitatekin konpara daiteke? Izan ere, organismoan zelula nonbait kokatuta dago, egitura tridimentsional batean; ehun batean, zelula jakin baten ondoan... aldiz, lerro zelularrean plaka baten gainean daude. Beraz, hazkuntza zelularra **in vivorako** baliagarria da?

Hazkuntza zelularrak bi dimentsiotan egiten dira, petri kutxaz kanpo ez dago ezer, zelula aurrera eta atzera soilik mugituko da. Baina errealitatean gora eta behera ere mugitu daiteke, hirugarren dimentsio bat du. Naturan zelula ingurune desberdinetan mugitzen da, eta bere tokia aurkitzen du. Oso zaila da



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

hazkuntza batean hiru dimentsio horiek jarri ahal izatea eta baldintza horiek denboran mantentzea oso zaila da. Muga hor agertzen da.

Interakzioei dagokionez, normalean zelula mota bakarra izaten da, batzuetan bi eta oso egoera konplexuetan hiru. Beraien arteko harremana, zelulak berdinak direnean beti bera izango da. In vivo askoz elkarrekintza gehiago (elkarrekintza heterotipikoak → zelula-zelula artekoak eta zelula-matrize artekoak).

In vivoko **homeostasiaren** (barne medioa orekan mantentzeko gaitasuna) eraenketa? Seinalizazio molekularak eta denboran zehar nola mugitzen diren. Guk sistema endokrinoa dugu, nerbio sistema, hormonak jariatzen ditu eta zelulek erantzun bat eman seinaleen aurrean.

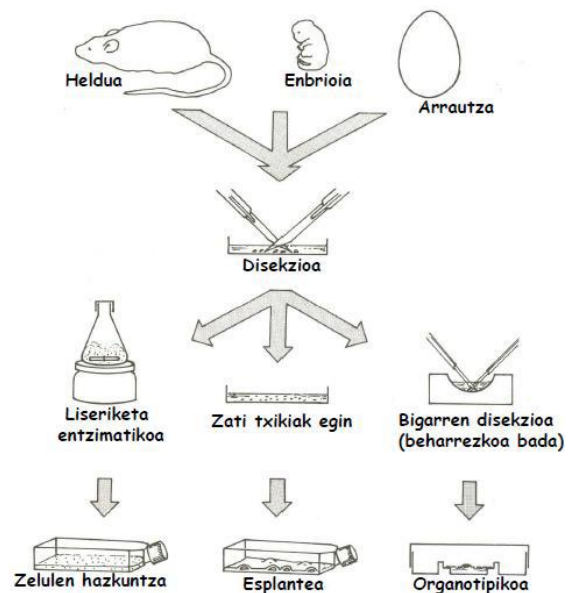
*“Ingalaterrako arrainak emeak dira beti. Haurdun ez geratzeko piluletako hormona urean kanporatzen da eta ez da depuradoretan garbitzen, ibaietara iristen da zuzenean. Arrainak ez dute kromosoma bat eme edo ar direla zehazten dutena, beraien inguruko egoeraren arabera aldatzen dira sexuz eta beren bizitzan sexu desberdinak izan ditzakete. Ibaietan seinale denak estrogenoenak direnez, denak emeak dira.”*

## 4. Hazkuntza motak

### 4.1 Organoak:

Organoen hazkuntzak, zuzenean tratatzen da laborategian. In vivoko ehunaren arkitektura mantentzen da: elikagaiak eta hondakinen kudeaketa. Baina, saio bakoitzerako material berria behar da, arazo etikoak.

- Abantailak: organo batean hainbat zelula mota daude eta beraien arteko elkarrekintzak aztertzen dira. 3D-ko egitura mantentzen da, organismoan duen egoera espazial bera du laborategian, jatorrizko organoen erreplika. Seinalizazioa oso mugatua da, ez dago nerbio sistema edo endokrinorik, baina hainbat seinale jariatzen eta beste batzuen aurrean erantzun emateko gai da. Organismotik gertuen dagoen hazkuntza mota.
- Desabantailak: organo bezala funtzionatuko duten zelulak honen periferiakoak soilik izango dira, egituraren erdirainoko elikagaien eta hondakinen fluxua oso mugatua delako, oxigenoa ere ez da hain barrura heltzen. Barrukoek hipoxia izango dute eta ez dute modu normalean erantzungo. Ezin dugu odol sistema konplexua mantendu laborategian. Baina informazioa eskuratzeko oso hazkuntza baliagarriak.



### 4.2 Esplanteak:

Ehunen edo organoen zatiak. Nahiko zati txikia izango da, erdiko zelulek ere hondakinak kanporatzeko, oxigenoa hartzeko edo elikagaiak heltzeko aukera izan dezaten. Puntu bateraino organoen egitura mantentzen da eta funtzionala izango da. Ez dago zelula desberdin askorik, ez dugu egitura konplexu bat, baina zelula guztiek modu beretsu eta efizientean funtzionatuko dute.



### 4.3 Zelulen hazkuntza:

Garrantzitsu eta erabiliena.

Hasiera batean disgregazio zelularra beharrezkoa zelulak eskuratzeko (entzimatikoa edo mekanikoa): organismo bat hartu, disezcionatu, zenbait entzima kontzentrazio zehatzetan edo baldintza berezietan jarri, zelulak askatu egingo dira. Kaderinek eta integrinek  $Ca^{2+}$  behar dute. Hauek gabe, zelulak ezingo dira elkarren artean lotu eta askatuko dira. Matrizea kendu ahal da kolagenoa degradatuz edo zelulen atxikimendurako beharrezkoak diren proteinen sintesia mugatzen da, transmitz proteinak.

Ondoren, esekidura zelularra lortuko dugu, monogeroza atxikitua (beirara...) edo esekidura gisa medioan. Batzuk jarraian lotuko dira beirara, beste batzuk zailago.

Behin populazio uniforme lortu dugunean, hazkuntza lortzeko elikagaiak, baldintza egokiak... Hauek ez dira ehunetan dituzten berak baina modu kontrolatuan, belaunaldiz belaunaldi mantentzea erraza izango da.

Jada jatorrizko heterogenizitatea galduta dute, populazio uniforme dira, proliferazio-tasa altuko zelulez osatua.

Gaur egun hazkuntza histotipiko desberdinak sortu daitezke eta baditugu teknikak zelulak errealitatean aurkitzen 3D-ko estruktura batean hazteko. Horrela, zelula mota desberdinak egitura horren gune desberdinetan haz ditzakegu eta benetako egoera imitatu. Kasu honetan, esponja itxurako egiturak dira, karbonozko tubuloak elkarren artean lotuak dituztenak. Horien gainean hazten dira zelulak.

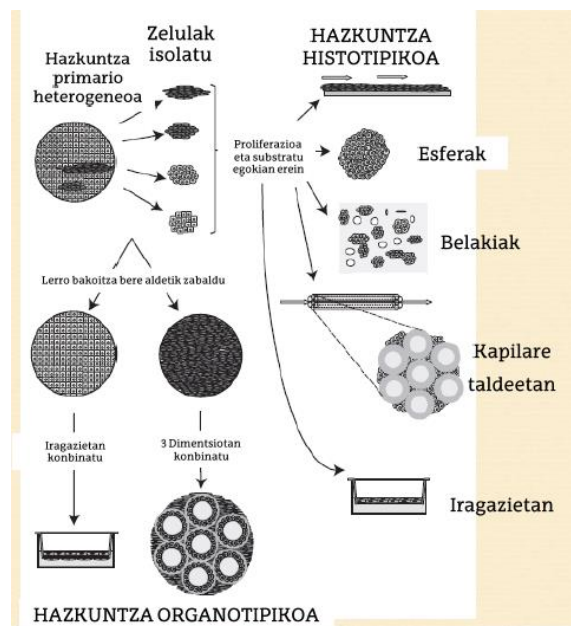
Zelulak zatitu edo **proliferatzea** beharrezkoa da. Esekiduran, flotatzen daudenean, zelula gutxi dira zatitzeko gaitasuna dutenak: zelula hematopoietiko helduak, lerro zelular eraldatuak, minbiziko zelulak.

Baina zelula gehienek substratu bat behar dute bertara atxiki eta zatitzeko.

Organismo batetik zelulak eskuratzean (adibidez gibelatik zelula erauzi + tripsina entzima zelulak banatzeko) kultibo zelular primarioa lortzen da. Zelula hauek, medio egokian (tenperatura- eta elikagai-baldintza egokiak) bikoiztu egiten dira, baina zelulak muga batetaraino zatitzen dira, horrek determinatzen du gure zelulen dentsitatea. Zelulek haien artean kontaktu asko izatera heltzen badira, zatitzeari uzten diote. Hazkuntza egiten jarraitzeko, saturatuta daudenez, beste petri kutxa baten beharra dago. Orduan, subkultibatu eta kultibo sekundarioa lortuko dugu. Horri esker, zelulek zatitzen eta proliferatzen jarraituko dute, baina zelulek bizi-periodo bat dute, zatiketa muga bat: Hayflick-en muga →

Zatiketa zelularretan telomeroak laburtuz doaz. Telomeroak base errepikakor batzuek (AATAATAATA...) osatuta daude, eta sekuentzia horiek, gaineztadura proteiko berezi bat sintetizatzen dute. Gaineztadura horrek DNA babesten du. Baina zatiketak aurrera doazen heinean, telomeroak laburtuz doaz, eta ondorioz, gaineztadura proteikoa ez da hain ondo sintetizatzen.

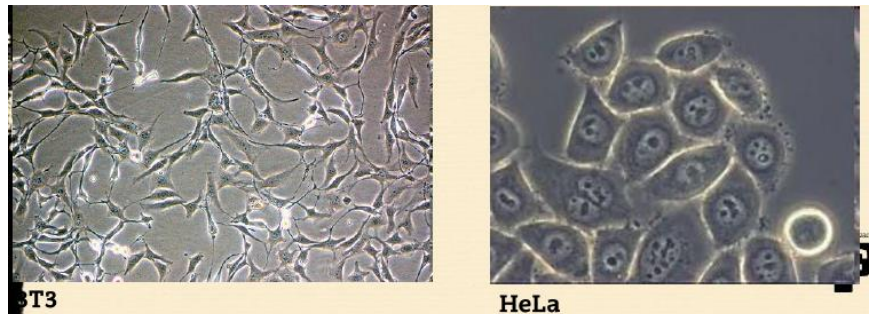
Ziklo zelularrean zenbait kontrol daude DNA ondo dagoen edo ez erabakitzen dutenak zatiketa burutu dadin. Kontrola pasatzen ez bada, heriotza zelularra gertatuko da.



Kultibo sekundarioa horretan zenbait zelula mota izango ditugu. Horietatik interesatzen zaizkigun zelulak aukeratuko ditugu, hor sortuko da **lerro zelular mugatua**.

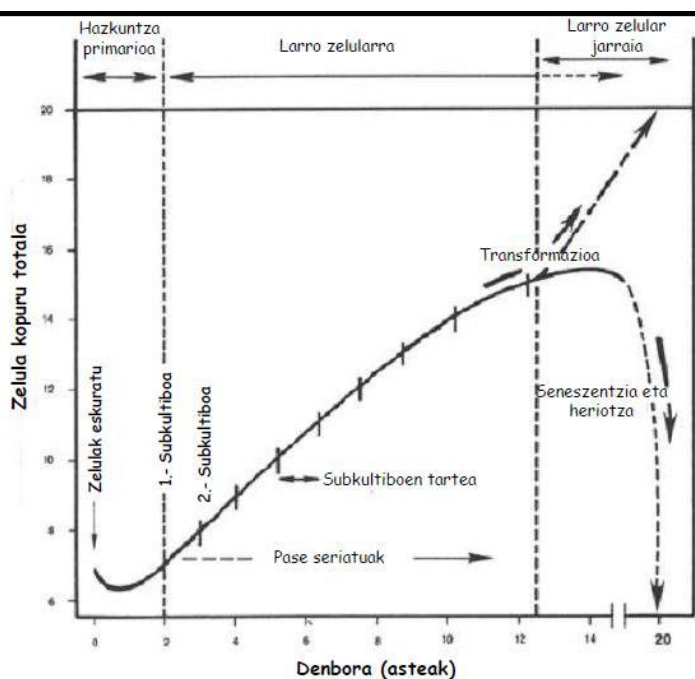
**Minbizi-zeluletan**, aldiz, ez da heriotzarik gertatzen. **Lerro zelular jarraia**k eskuratzen dira, hauek kultibo zelularrean mugagabe zati daitezkeen zelulen populazioak dira. Izan ere, minbizi zelulek telomerasa entzima dute, eta horren bidez, telomeroetan galtzen duten informazio zatia berreskura dezakete. Lortu diren lerro zelular batzuk:

- 3T3 (saguaren fibroblastoak)
- HeLa (gizakiaren epitelio-zelulak)
- L6 (arratoiaren mioblastoak)
- RTG-e (amuarrairenen fibroblastoak)



Zelula horien zatiketa kontrol puntuak inhibituta daude. Minbizi zelulen

ezaugarri horretan oinarrituz, zenbait lerro zelular arruntak minbizi zelula bihurtzen dira, eta hilezko bilakatzen dira. Lerro zelular hauen berezitasuna beraien dotazioa da; zatiketa zelularrak ondo ematen ez direnez, kromosoma kopuru handiak sortzen dira. Beraz, hau kontuan eduki behar da esperimentuaren arabera. Momentu batean honen zelulen heriotza ekar dezake.

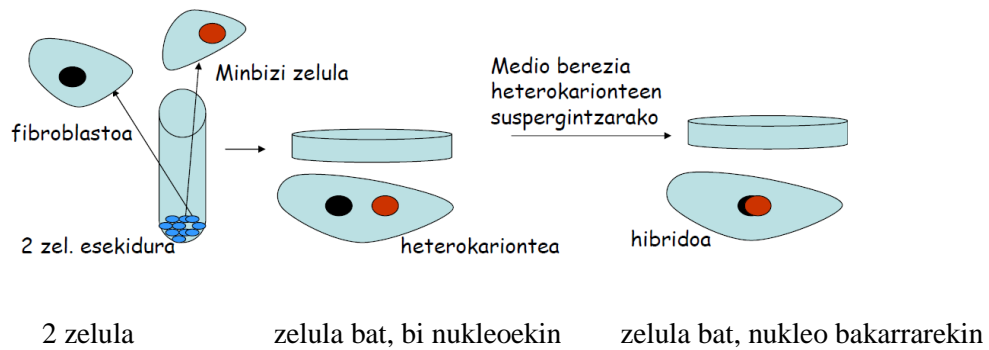


Telomeroen murrizketaren mekanismo hori, bi aurpegiko txanpon bat dela kontsideratu genezake; zelulen zatiketa mugatu eta beraz, zahartzera bideratzeaz gain, minbizia izatetik babesten baikaitu.

Gaur egun, zelula helduek hazkuntza mugatua dute, baina proliferazioarako optimoak diren baldintzetan jartzen badira, hazkuntzak normalen baino gehiago izatea lor dezakegu. Desberdintzat gabe dauden zelulekin ere modu berean jokatzeko da; desberdintzapena bultzatzen duten baldintzen pean jarri. Adibidez, desberdintzatuta dagoen zelula heldu batean ixilarazitako geneak berriaz azaleratu daitezke, eta horren bidez, gure interesko zelulak sintetizatzen erabili dezakegu.

**Klonak**, lerro zelular bereziak eta ondo definituak dira, zelula bakar batetik eratorriak. Hau da, zelula mota bakar bat aukeratzen da kultibotik eta honen etengabeko hazkuntzatik sortzen direnak, guztiak berdin berdinak izango dira.

**Zelula heterokarioentea**, bi zelula moten fusioa eta bi nukleo bananduta dituen zelula konbinatua da. Zelula honek mitosia burutzen duenean, bi nukleoetako kromosomak nukleo bakar baten barruan batera dituenean, zelula hibridoa lortzen da. Eta hibrido hauek klonatu egun daitezke lerro zelular hibridoak emateko. Adibidez, adipozito bat eta minbizi zelula fusionatu (**hibridoma**) eta zatitzen hastean, bi ezaugarri horiek mantenduko dira, desberdintzapena eta etengabe zatitzeko ahalmena. Zelula alaba guztiek ez dituzte ezaugarri horiek izango, arrakasta oso baxua.





## 12. Animalia zelulen laborategia

### 1. Tresneria

#### 1.1 Fluxuzko kanpaia

Zelulak hazteko ingurune garbi bat behar da, aldakortasun txikia izateko, zelulak gutxi kutsatzeko eta ondo hazteko. Baina, baldintza hauek onak dira bakterio, onddo edo bestelako izakientzako. Horretarako, ingurune hori hauetatik garbi mantentzen laguntzen digun tresnaren bat behar da.

Kanpai honek, zelulekin **egoera aseptikoan** lan egiteko ingurune berezi bat eskaintzen digu. Helburua, partikularik gabeko eta kutsadurarik gabeko airea lortzea da. Horretarako, ingurunekeo aire zikinaren fluxua **filtro** batzuetatik pasatzen da eta bertan bakterioak, esporak, etab. hil ondoren, aire garbiaren **fluxua** lan egingo dugun ingurunera askatzen da.

Kristal bat du, kanpoaldea eta barnealde bereizten dituen eta eskuak sartzeko gune bat du. Kanpaiko gune batean presio negatiboa egongo da; hau eragingo du airearen mugimenduak eta honen bidez, partikulak ez dira lan gunera sartuko.

Lanean hasi baino lehen, kanpaia alkoholaz garbitzen da eta esterilizatu. Gainera, zenbait fluxuzko kanpaietan argi ultramorea jartzen da gauez, nahi ez diren izakiak hasi ez daitezen.

Bi fluxu kanpai mota daude: bertikalak edo horizontalak. Bertikalak egokiagoak dira produktuak babestear gain ikerlariaren babespena ere ematen baitute. Horizontalek aldiz, produktuen babesa soilik bermatzen dute.

**Gela zuriak:** fluxuzko kanpai handi bat, gela bat osorik.

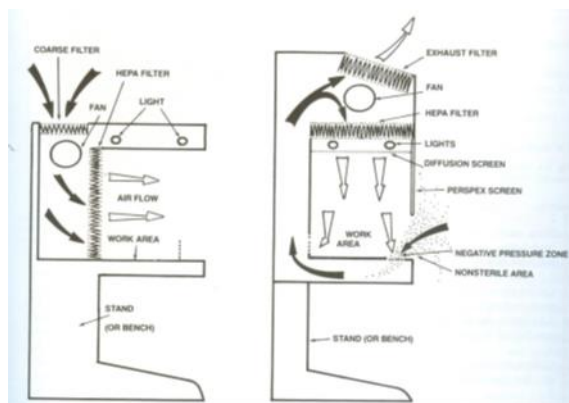
#### 1.2 Inkubadorea

Inkubadoreak, orokorrean hitz eginda, labe bereziak dira non bertan tenperatura erregulatu daitekeen aztertzen ari zaren zelula hazkuntza motaren arabera. Zelulak haztea nahi dugunean, hemen sartzen ditugu. Hemen, zelulak baldintza egokietan mantentzen dira, T<sup>a</sup>, pHa, elikagaiak, CO<sub>2</sub>...

**Adibidez:** Giza zelulak 4°C-tan inkubatzen dira egoera normalean egoteko, denbora jakin batez mantentzeko 16-24h; -196°C-tan izozten dira zelula hauek urteak iraun dezaten, hortik berreskuratu daitezke; eta 37°C+2°C bitartean tenperatura aldatzea letala da zelula hauentzat. Giza zeluletan, 36-37°C, baldintza optimoak. Poikilotermoak tarte zabalagoan. Homeotermoak 33-37°C, hazkuntza-desberdintasuna 0,5°C. Arrainen kasuan, berriz, 18°C inguruan mantentzen dira.

Zelulak oso sentikorrak dira tenperatura aldaketa txikietarako.

Inkubadora orokor hauetaz gain, badaude beste zenbait espezializatuagoak, CO<sub>2</sub> inkubadoreak, adibidez. Inkubadore hauetan tenperatura kontrolatzeaz gain, CO<sub>2</sub>-ko atmosfera eta hezetasun egokituak ere erabaki daitezke. Inkubadoraren ondoan dagoen kutxa berezi baten bidez lortzen da hau. Honek, CO<sub>2</sub> %5-eko kontzentrazioan jartzen du, hori baita gure zelulek gure gorputzean duten egoera. Baldintza hauek nahiko konstante mantendu behar dira, zelulak oso sentikorrak baitira.



Baina baldintza aseptikoek, aldiz, ez dute hain zorrotzak izan behar gela eta kanpaiean ez bezala, zeren erabakitako ingurune baldintza hain espezifiko horietan hobekien haziko diren zelulak gure interesekoak izango dira, eta gainerako onddo, bakterioak... hiltzeko probabilitate handia izango dute. **Kultibo zelular primarioak** eta **lerro zelular egonkorak** ez dira inoiz batera sartuko inkubadoran.

Askotan, zelulak urteetan edo hilabeteetan mantentzeko, sakarosa erabiliz kriobabesten dira eta ondoren nitrogeno likidoan izozten dira. Protokolo bereziak jarraituz, berriro giro tenperaturara bueltatu eta berriz esperimenduekin jarraitu ahal da. Horregatik, une horretan zelulekin lanean ari bazara soilik sartzen dira inkubadorean, baina bestela ez.

### 1.3 Estufa

Zenbait neurketa egiteko.

### 1.4 Izozgailuak, N2 likidoa...

Zelulak edo errektiboak luzaroan mantentzeko izoztu egin daitezke, eta horretarako izozgailuak edo nitrogeno likidoa erabil daiteke. Zerekin lan egiten ari garenen arabera, izozte puntu batzuk edo beste batzuk erabiliko ditugu:

- 4°C → medioak
- 20°C → sueroa, gehigarriak (glutamina, antibiotikoak), entzimak
- 80°C → sueroa, gehigarriak (epe luzerako gordelekua)
  - Produktu sentikorrak (hazkuntza-faktoreak, mitogenoak: ziklo zelularretan parte hartzen duten faktoreak, zatiketa bultzatuz...)
- 196°C → lerro zelularren gordelekua

### 1.5 Autoklabea

Materialen esterilizaziorako erabiltzen da: pipetak, puntak, pintzak, artaziak, beirazko materiala... Material hauek presio eta tenperatura altuen pean jartzen dira eta baldintza horietan, inguruneke bakterioak eta mikroorganismoak hiltzea lortzen da. Hortik fluxuzko kanpaina eraman eta garbi mantenduko dira.

Likidoak

T=121°C, P=1atm, denbora=20 minutu.

### 1.6 Bestelakoak

- Pipetak: ura purifikatzeko sistema, bi destilazio + iragazpena.
- Balantzak
- pHmetroa

### 1.7 Zentrifugak

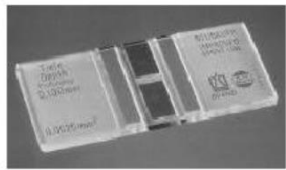
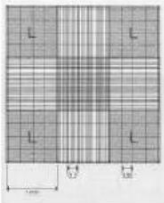
Zentrifuga mota desberdinak daude:

- Errefrigeratua (hotzean mantentzen direnak)
- Bolumen aldakorra onartzen dutenak (1-2mL / 250-500 mL)
- 2000xg

### 1.8 Zelulen zenbatzaileak (cell counter)

Automatikoa (esekiduran dauden partikulen kontaketa)

*Cell counter (zelulen zenbatzailea)*

**Zelulak / ml**     $= ((L1+L2+L3+L4)/4) \cdot 10000$

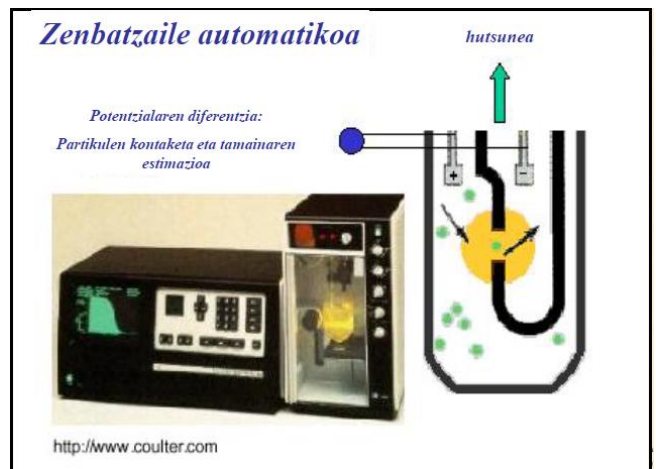
**HEMOZITOMETROA**  
(NEUBAUER ganbara)

Zelulak zenbatzeko teknikak desberdinak dira. Orain arte erabili izan dena **hemozitometroa (Neubauer ganbara)** da.

Hau, zelulen ganbara kontatzailea da, porta berezia. Badakigu karratu bakoitzaren bolumena, medio bat sartu eta esekiduran jartzen dira. Mikroskopioan ikusten da zenbat ditugun eta formula bat erabiliz, estrapolatu egiten da guztira zenbat zelula ditugun. Metodo desberdinak daude.

Erabili aurretik guztiz beharrezkoa da garbitzea. Askotan hautsa sartzen da eta ondo lehortzea beharrezkoa da neurketa ahalik eta egokiena eta azkarrena izateko. Kontaketa hauek egiteko, mikroskopioan argiak ematen die zelulari eta horrek zelulak estresatzen ditu eta begiratzen denbora larregi bagaude, hil egiten dira eta kontaketa akatsak agertuko dira.

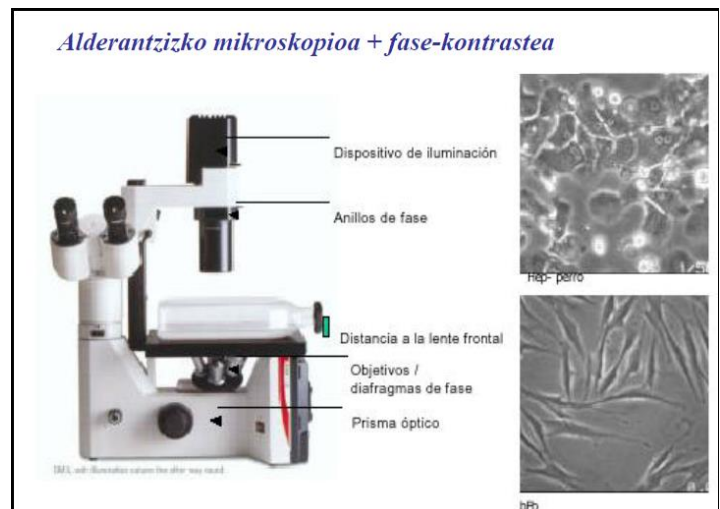
Azken urteotan, ordea, **zenbatzaile automatikoak** sortu dira. Hauen funtzionamendua honakoa da: zelulen suspentsio bat hartu eta hodi fin-fin batzuetatik igaroarazten dira, fluxua pasatuz doa potentzial diferentzia baten bidez. Hodi horretatik zelularen bat pasatzen denean, turbulentsia bat sortuko du, eta makinak, hodiak zenbat turbulentsia jasan dituen kontatuko du; hots, zenbat zelula pasatu diren. Azken tresneria berrien artean, turbulentsia neurtzeaz gain, hoditik pasatako **zelulen tamaina** neurtzeko gai diren zenbatzaileak daude. Baina, oso aparatu garestiak dira.



### 1.9 Alderantzizko mikroskopioa:

Argia goitik dator, zelulak zeharkatzen ditu eta ispilu baten bidez nire begietara heltzen da interesko irudia. Argi iturria zeluletatik urrutiago dago eta estres hori sortzea ekiditen da zati batean.

5-7 mikrometrokoa baino lodiagoak diren laginak erabili daitezke eta, horren ondorioz, fokatze eremu zabalagoa da mikroskopio arrunt batean baino, hobeto ikusten da zelula bere osotasunean. Hala ere, erresoluzioa ez da hain ona. Arruntean hobe, egitura txikiagoak bereizteko gaitasuna, argia lanparatik laginera heltzeko bidean galdu egiten delako. Lagina luzaroan zehar aztertze oso erabilgarria.



### 1.10 Mikrozittagailuak, mikrodisektoreak:

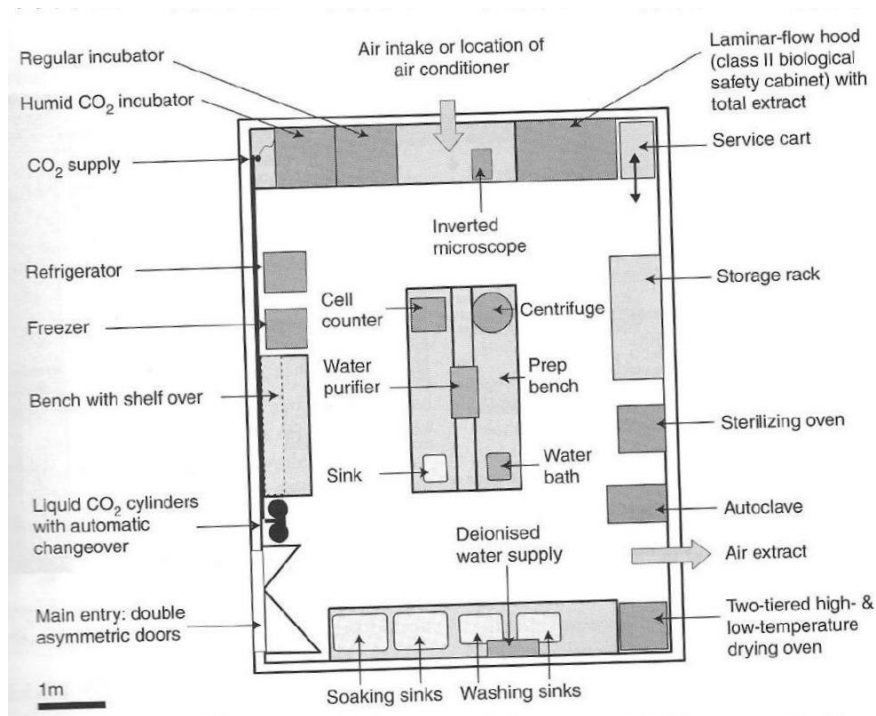
Alderantzizko mikroskopioak bezalakoak dira, baina honi atxikituta pintza, mikropipetak... eta antzeko tresneria izaten dute. Horrela dauzkagun zelulak ikusten ditugula, hauek manipula ditzakegu.

Zelulekin lan egiten bada, zelulak in vitro manipulatzeko beharrezkoa da. Pipeta oso fin bat erabiltzen da, makina batek kontrolatzen duena eta horren bidez, zuk egiten dituzun mugimenduak pipeta horretan proiektatzen dira. Oso erabilgarria hazkuntza zelularretan.





**Laborategiko gailuen distribuzioa** garrantzitsua. Fluxu kanpaiak leihotik ahalik eta urrunen, aire korrontetik babestuta.



## 2. Hazkuntza baldintzak

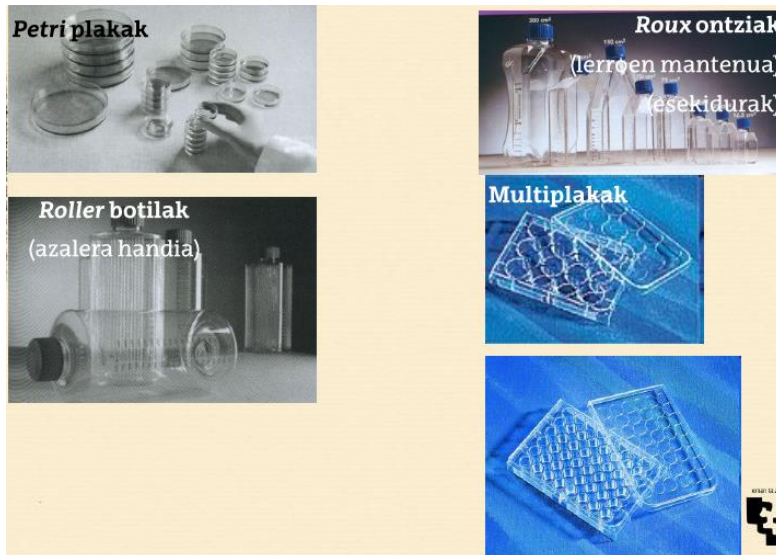
### 2.1 Substratua

Zelulak nonbaitera atxikituta egotea beharrezkoa da. Eta oso garrantzitsua da, izan ere, zelulak zatituko badira, atxikituta egon behar dute. Zelula guztiek ez dute substratura lotzeko atxikimendu nahikoa, hau aurretik ezagutzen da eta, horren ondorioz, substratu desberdinak daude:

- **Kristala:** gehien erabiltzen dena.  
Abantailak: merkea eta gardena da, tresneria substratu gardenentzako prestatuta. Oso erraz esterilizatu daiteke. Zelula gehienek kristalera atxikitze gaitasuna baina ez da atxikimendu ona, arazoak. Epitelio zelulen kasuan oso atxikimendu ona.  
Desabantailak: Zelula guztientzat ez da substraturik egokiena, adipozito edo neuronek ez dute gustukoegi. Horren arabera aldatu. Oso disoluzio alkalinoak erabiltzen baditugu (adib. tripsina erabili ordez, NaOH erabiltzen badugu), konposatu horren gatzak oso erraz prezipitatzen dira kristalaren gainean. Zelulen suspentsio berri bat horra botatzean, kristaleko gatzak medio berri horretan disolbatzen dira eta beren pH-a igoarazten dute.  
 Beraz, kristalak erabili eta gero, oso ondo garbitu behar dira.
- **Plastikoak:** Mota desberdinetakoak daudenez, aukera gehiago.  
Abantailak: normalean merkeak, erresistentzia handikoak, gardenak. Zelulak ondo atxikitzen dira. Plastikoen kimika erraz aldatu daiteke, azido batekin tratatuz adibidez, kimikoki aldatu eta zelulen atxikikortasuna aldatu daiteke, hobetu daiteke. Kristalak azidoaren aurrean ez du aldaketarik emango. Beti ere pasatu gabe.  
Desabantailak: Plastiko ez da kristala bezain inerteia eta horren ondorioz, zelulen aldaketek plastikoetan aldaketak ekarri ditzake eta polimero toxikoak askatu ahal ditu zelulentzat.  
 Beraz, plastikoak noizbehinka aldatzea beharrezkoa da.
- **Bestelakoak:** paladioa eta altzairua.  
 Zenbait zelula ez dira ez plastiko ez kristalera lotzen: Glia zelulak hazkuntzetan aztertzea oso zaila da, atxikitze muga ugari. Ez badira atxikitzen, hiltzen joango dira eta oso denbora

laburrean mantenduko dira hazkuntzetan. Hala ere, Glia zelulak oso ondo atxikitzen dira metal hauetara. Ez dira material gardenak, ez ditu argiak zeharkatuko, beraz ikusteko mikroskopio bereziak erabiliko dira, **transmitantzia**. Erresoluzioa ez da ona, muga ugari.

- Zenbait kasutan, substratuari **kolageno** disoluzio bat edo **fibronektina** gehitzen zaizkio. Hauek, matrice estrazelularreko substantziak dira eta zelulekin interakzionatuz, hauek ontzira lotzera behartuko dituzte..



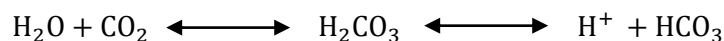
24 putzutako plakak. Beirazko edo plastikoko materiala gehien bat.

## 2.2 Fase gaseosoa

Zelula gehienek mitokondrioak dituzte eta hauek arnasketa egiten dute. Ondorioz, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> gas trukea gertatzen da. Kultiboaren arabera, oxigeno eta CO<sub>2</sub> kontzentrazio egokiak beharrezkoak dira.

- **Oxigenoaren** beharra oso desberdina kultiboaren arabera. Orokorrean, atmosferako kontzentrazio edo zertxobait baxuagoa faboragarria da. Jarduera oso handia bada, oxigeno beharra oso handia izango da. Inkubadorean, adibidez, zelula muskularrekin lanean ari bagara, hauek oso aktiboak direnez, zenbait kasutan oxigeno maila altuagoa beharrezkoa izango da eta oxigenoa ponpatzen duen egitura bat izango dugu inkubadoreari lotuta, oxigeno maila altuago mantentzea ahalbidetuko duena.
- **Karbono dioxidoarekin** interakzio konplexuagoa sortzen da. Honen kontzentrazio egokia mantentzea oso zaila da. CO<sub>2</sub> inkubadorean badago, denbora aurrera doan heinean, hazkuntza medioan disolbatuko da, horren gehiena ura delako. Zenbait erreakzioen bitartez azido karbonikoa sortuko da eta medioaren pHa aldatu egingo du, azidifikatzen joango da.

*Itsasoa azidotzen ari da eta moluskuek eta ostrek ezin dute beraien maskorra sortu.*



## 2.3 Ezaugarri fisiko kimiko egokiak:

- pH: 7,4-7,7 optimoa (5,5 ere posible, azalaren pH-a)
- Tanpoiak: bikarbonatoa edo HEPES. Molekula indargetzaileekin, CO<sub>2</sub> oso altua denez, azido karbonikoa sortu eta pH-a jaisten denez, orekatzeko tanpoiak gehitzen zaizkio
- Osmolaritatea: 260-320 mOsm/kg (plasma 290 mOsm/kg)
- Tenperatura: 36-37, 36'5
- Azalera-tentsioa: kontrol gutxi (kasu gutxitan)

- Biskositatea: suerorik gabe edo kontzentrazio gutxiko suerotan garrantzitsua  
Zenbait zelularentzat beharrezkoa da baina, beste batzuentzat haiek dakartzaten baldintzekin nahikoa. Normalean baino biskositate altuagoa jartzen da adibidez, kondrozitoen kasuan behar bezala garatzeko asmotan.

*Adibidez; CO<sub>2</sub> ekoizten denean azalean ponpak sortzen dira, eta ondorioz, gasen elkartrukea ez da ondo gertatzen.*

## **2.4 Baldintza fisiologikoak:**

Zelulak zatitzera edo haztera bultzatu behar dira, eta horretarako baldintza egokietan egon behar dira. Kasuan kasu desberdinak izango dira, zelula motaren arabera edo zelulen baldintzen arabera aldatuko dira: populazioa handia edo txikia, dentsitatea, jatorriaren arabera... Medioari zenbait gauza gehitu behar zaizkio. Hauek dira aldakorrenak.

Elikagaietan egongo da desberdintasuna zelulen arabera, hormonak gehitu. Zenbait kasutan ez gehitu ezer, zelulak desberdintzatzen hasteko asmotan.

- Ezinbesteko aminoazidoak
- Bitaminak
- Gatz soluzioak
  - Gatz inorganikoak (bikarbonato sodikoa + glukosa)
  - Glukosa (energia)
- Pisu molekular baxuko gehigarri organikoak
  - Krebs ziklokoak, pirubatoa, lipidoak...
- Zelulen hazkuntzaren estimulatzaileak
  - Seru bobino fetala, FBS, fetal bovine serum
  - Ahuntzaren seru fetala, FCS, fetal calf serum
  - Giza-serua (HuS)
  - Horse serum (HoS)
- Hormonak
- Kutsadura mikrobianoa ekiditeko antibiotikoak: gehienek. Oso egokiak mediora jausten diren bakterioak hiltzeko, izan ere medioa aberatsa da zelulak behar bezala hazteko, baina beste izaki batzuk hazteko ere ona izan daiteke.  
Normalean ez dira espezifikokoak, baina medioa beti zelula berekin kutsatzen bada, horren aurkakoak jarri.
  - Penizilina + etreptomizina (mikrobianoa)
  - + fungizona (mikrobianoa, onddoak)
  - Gentamizina (mikrobianoa)
  - Anfoterizina (onddoak, legamiak)
- Bestelakoak
  - Fibronektina, laminina
  - Proteasen ezabatzaileak
  - Hormonak
  - Elikagaiak - Fe, Cu...
  - Proteinak, poliaminak
- Berriztapen periodikoa: medioan elikagaiak gastatuz, hondakinak gehituz... Ez da ona zelulentzat eta medioa aldatu beharra dago noizean behin. Zelula motaren arabera, zehaztuta zenbatero.



### 3. Hazkuntza bereziak/espezifikokoak

#### 3.1 Modelatuak.

Gaur egun badaude mekanismoak putzu kopuru zehatz bat duten plaka baten barruan, putzu kopuru adina zelula hazkuntza izateko. Gainera, horietan gerta liteke batean zelula bat, bestean beste hazkuntza mota bat... izatea, existitzen diren teknika berriei esker. Horren bidez, plaka baten barruan zelula kondizioa desberdinak egongo dira eta hau mekanizatuta badago, hau da, aparatu batera konektatuta badago, putzutxo bakoitzean zer gertatzen den aztertu daiteke.

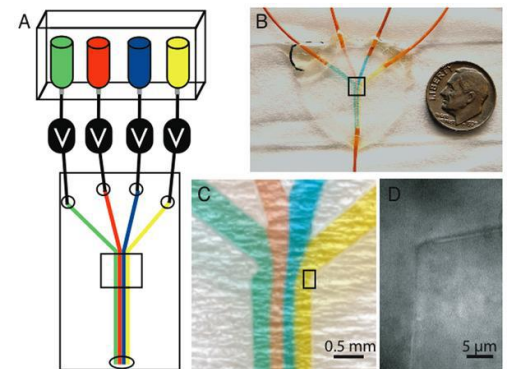
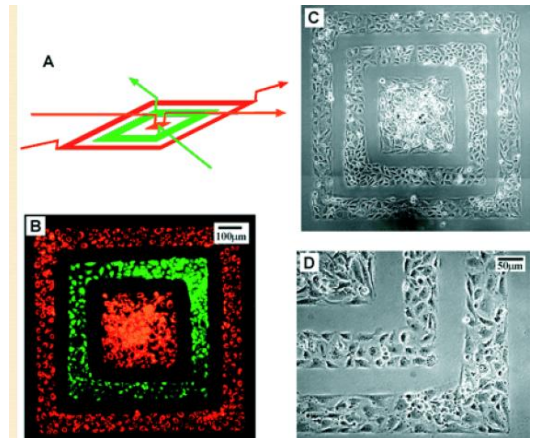
Teknologien bidez zelulen kontrol optimizatua dugu, zelulak banaka aztertu eta zelulen interakzioak bideratuz zenbait organoren erreplikak egin daitezke.

Hazkuntzan zelulak hasieran bakoitza beraren baldintza optimoetan egongo dira. Ondoren fluido desberdinak gehitzen zaizkiete eta hazkuntza desberdinak izanik, fluido bakoitzak hauen gainean duen eragina ikus daiteke.

**Fluxu laminar bidezko modelatua**n, azalera bat eta bertako zelulen kokapena modelatu daiteke. Baita ere fluidoaren arteko patroiak modelatu daitezke. Beraien dimentsio txikiak direla eta, **mikrofluido** sistemetan gertatzen diren fenomenoak baliatuz aplikatzen da.

**Adibidez**, porta bat dugu, hazkuntza desberdinekin. Horietara, kanal desberdinak helduko dira, jariakin desberdinak garraiatzen dituztenak; organulu espezifiko bat tindatzen duen likidoa, adibidez. Hazkuntza zelularretan ematen diren erantzun desberdinak aztertu daitezke. Gainera, oso kantitate txikiko fluidoekin edo zehaztasun handiz egiten dira froga hauek, **mikro egoera** batean oso egoera desberdinak eta oso kontrolatuak izan ditzakegu porta baten barruan.

5000 zelula badituzu, 5000 zelula horiek beste horrenbeste egoera desberdinetan aztertzeke aukera duzu. Adibidez zeinek duen desberdintatzeko joera handiena. Milaka esperimentu desberdin egin daitezke, oso maila txikian.

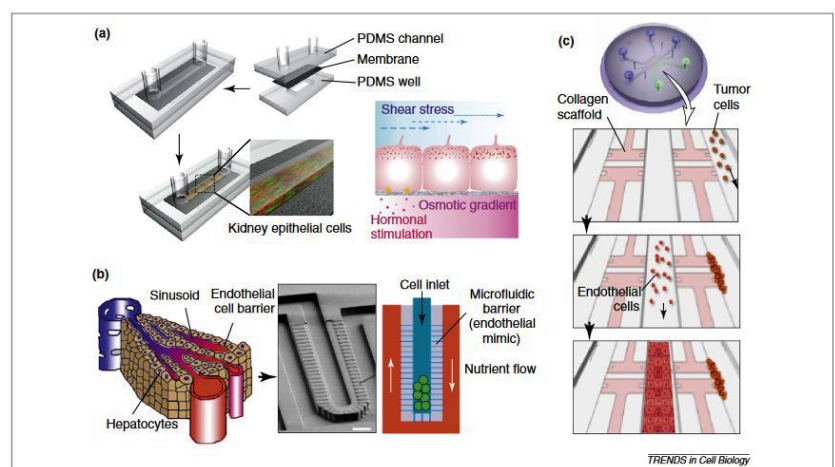


#### 3.2 Organ on a chip

Mikrofluidoaren sisteman eta hazkuntza zelularretan oinarrituz, hazkuntza horietan zelula-mota zehatz bat, **zelula epitelialak** hazi daitezke. Nahiko hazten direnean, fluidoak aldatu eta beste zelula batzuk hazten dira. Beraien arteko elkarrekintzak aztertu daitezke, organo bat bezala daudenean agertzen direnak. Porta baten barruan organo baten zelula desberdinak.

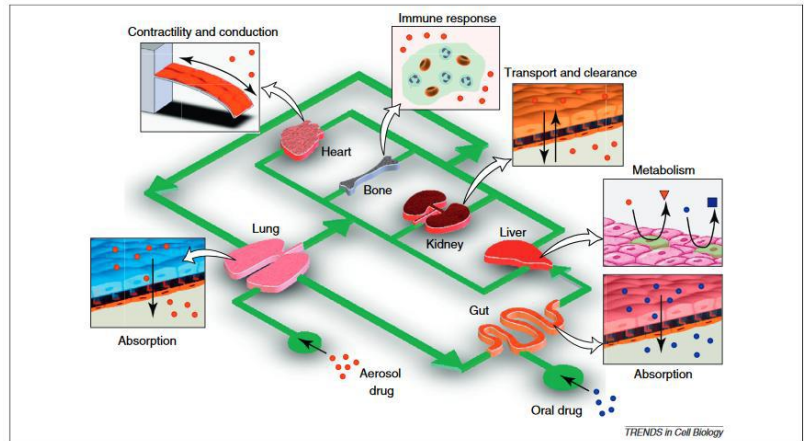
#### 3.3 Human on a chip

Porta batean hainbat zelula mota desberdin izango ditugu, organo desberdinetan agertzen diren zelulak izango dira eta hortik organo bakoitzaren zati bat lortuko dugu. Lortutako organo lagin hori gero porta handiago batetara eramanda anplifikatu egingo da.



Gizaki oso baten zelula mota guztiak gorde eta hazten jarri daitezke eta istripuren bat egotekotan, ez da erretxazorik emango... Zure zelula propioak direlako. Hala ere, horrek gero gorputzean txertatzeko asmotan anplifikazioak egin beharko dira.

Zelula desberdintzatu bat berriz ere zelula ama bihurtu daiteke eta hori gero zure intereseko zeluletan bihurtuko da. **Birprogramatu** egingo da. Zelula ama induzitu bat lortuko da, zuk isildu interesekoak ez diren geneak edo aktibatu interesekoak. Baldintza egokietan eta faktore desberdinetan jarrita zelula desberdinak lortu daitezke, gorputzeko zelula bakan batzuetatik abiatuta.



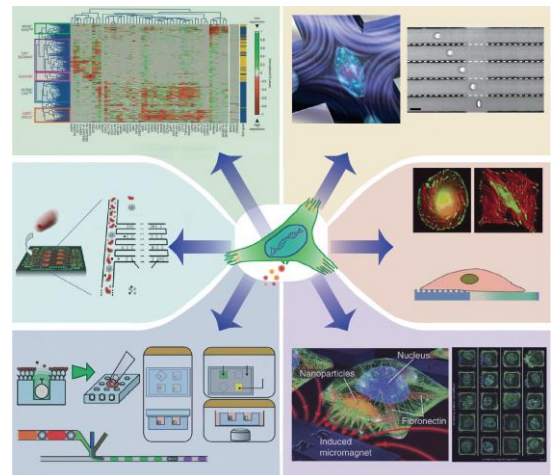
Maila mikroskopikoan zelulan duten antolamendua hartzen dute, benetako egituraren antzera berrantolatzen dira; baina, geruza kopuru handia lortzea zaila da.

Zenbait organok (birikiek) zelula desberdin ugari dituzte eta horregatik, oso zaila da horiek sintetizatu ahal izatea.

### 3.4 Zelularik gabeko in vitro sistemak

Hazkuntzak ez dira soilik zelulenak izaten: mitokondria, EE...-en hazkuntzak ere eduki ditzakegu. Hazkuntza hauek, funtzio biologikoa mantentzen duten frakzio zelularren homogenatuak dira, eta zenbait organulu zelularren zereginak eta ardurak ikertzeko erabiltzen dira:

- Mitokondrio eta kloroplastoen energiaren transdukzioarako sistemak ikertzeko
- Erretikulu endoplasmatico leuna eta bikortsuaren besikulak ikertzeko → EE mantentzea oso zaila
- Itzulpen-tresneriaren in vitro sistemak (erribosomaz osatuak), sintesi proteikoaren mekanismoak... ikertzeko:
  - DNAREN erreplikapena eta transkribapena
  - RNAREN moztitsasketa
  - Uzkurketa muskularra
  - Partikulen garraioa mikrotubuluaren gainean
  - Zatiketa zelularren zikloa
  - Kromosomen banaketa eta migrazioa **ehoardatz mitotikoan**
  - Erretikulu eta golgi aparatuen arteko garraio besikularra



### Hazkuntza mitokondrial/EE hazkuntza

Soilik mitokondrioak hazi, inolako kanpo ingurunearekiko elkarrekintza gabe, edo erretikulua sintetizatu eta zatitu ahal izatea.

# 13. Animalia zelulen isolaketa eta karakterizazioa

## 1. Entzimen bidezko isolaketa

### 1.1 Disekzioa

Interesekoa zaidan organo zati hori eskuratzen dut disekzio bidez. Baldintza faboragarrietan mantendu behar dira eta ahalik eta arinen disekzionatu. Zati txikiak ebaki eta hauek hazkuntza medio batean jartzen dira. Zelulak zatitzen joango dira.

Hazkuntza medio horretan zelula mota desberdinak izango dira, ebakitako zatia ez delako nahikoa fina zelula mota bakarra bertan egoteko. Garbiketa desberdinak egin ondoren, gero eta hazkuntza sinpleagoak eskuratzen joango gara eta azken garbiketan medioa kenduko diogu. Medio geruza fina gehitu, inkubatzeko eduki eta zelulak substratutik askatuko dira. Orduan, **esplante** bat lortzen da.

Hala ere, zelula mota bakarra eskuratzeko isolaketak, beste pausu bat eskatzen du, zelulak banan banan eskuratzeko. Teknika desberdinak daude, horien artean entzimak erabiltzea. Adibidez, **tripsina**.

### 1.2 Tripsina

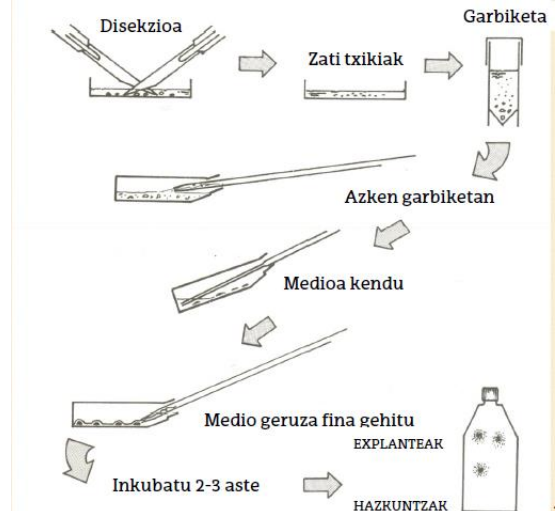
Ehun lagina ebaki eta egitura zati txikiak lortzen dira, garbitu eta ehun edo organo hori tanpoi batean edo kultibo medio batean jarriko da hazteko asmoz.

Kasu honetan, hazkuntza medioari tripsina gehituko zaio. Honek, zelulen arteko loturak apurtzen ditu eta atxikidura zelularrerako molekula berriak eratzea ekiditen da. Horrela, esekiduran zelulak banan-banan agertzea ahalbidetzen da. Luzaroan badaude tripsinarekin kontaktuan, mintza eta baita zelula bera ere hil egingo dira.

Zelula hazkuntza medio jakin batean jarri eta gure intereseko zelulekin geratuko gara.

Bi tripsinizazio mota:

- **Tripsinizazio epela:** zatiak 3-4 orduz tripsinarekin kontaktuan jarri, 30 minuturo utzi ezartzen eta tripsina berria jarri. Amaitzean, tripsina kendu eta zentrifugatu. Gero, lortutako *pellet* guztiak esekiduran jarri eta nahastu. Zelula banatuak lortuko ditugu. Prozesu hau zelula motaren arabera, oso agresiboa izan daiteke eta zelulak hil daitezke. Biderakortasun oso txikiko zelulak lortzea gerta liteke.
- **Tripsinizazio hotza:** esplanteak hartu, hotzetan utzi denbora batez eta tenperatura baxuan (4-8°C gradu bitartean) dagoela, **tripsina hotza** gehitu. Tenperatura hauetan tripsinaren eragina txikiagoa da eta denbora gehiago behar duten arren, tripsina horrekiko sentsibleak badira, modu honetara zelulak banaka egotea lortuko dugu eta sentsibleak diren horien kasuan bideragarriak izatea. Sueroaren bidez isolatu.



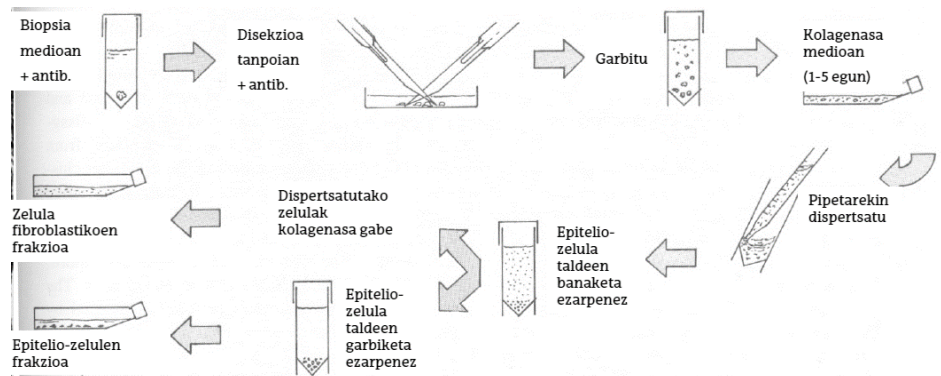


Amaitzean zelulak kontatu, diluitu eta gure interesko zelulak hazteko inkubatzen jarriko dira fraskoetan. Batzuk goian esekiduran jarriko dira eta besteak fraskora itsatsita.

### 1.3 Kolagenasa

Ez da zelulentzako tratamendu hain gogorra. Ehuna lortu, disezio bidez eta garbitu ondoren 1-5 egun zehar kolagenasarekin inkubatu behar dira. Denbora luzez. Horrela, zelulak ez dira bata bestearekin lotzen eta kolagenora lotzen dira. Oso erraza eta merkea da.

Inkubazioaren ondoren, kolagenoa apurtu eta zelulak pipetarekin dispersatzen dira. Zenbait kasutan, zelulen atzikitze ahalmenean oinarrituta, azpipopulazio desberdinak eta banatuak lortu ditzaket: adibidez, epitelio zelulak taldekatu eta azpian jarriko dira; ehun konektiboko zelulak berriz, ez dute taldekapenik sortuko eta suspentsioan geldituko dira. Horrela bi zelula mota banatuko ditugu.



Hazkuntza zelular bat lortu, zelula mota bakarra duena. Zelula mota denak berdinak izanik, hazkuntza medio bera dute denek eta hazkuntza faktoreak ere berak.

Metodo honen bidez, ezin dira epitelio zelulak beraien artean bereizi, horretarako, tripsina eta isolaketa termikoa behar dira.

## 2. Isolaketa mekanikoa

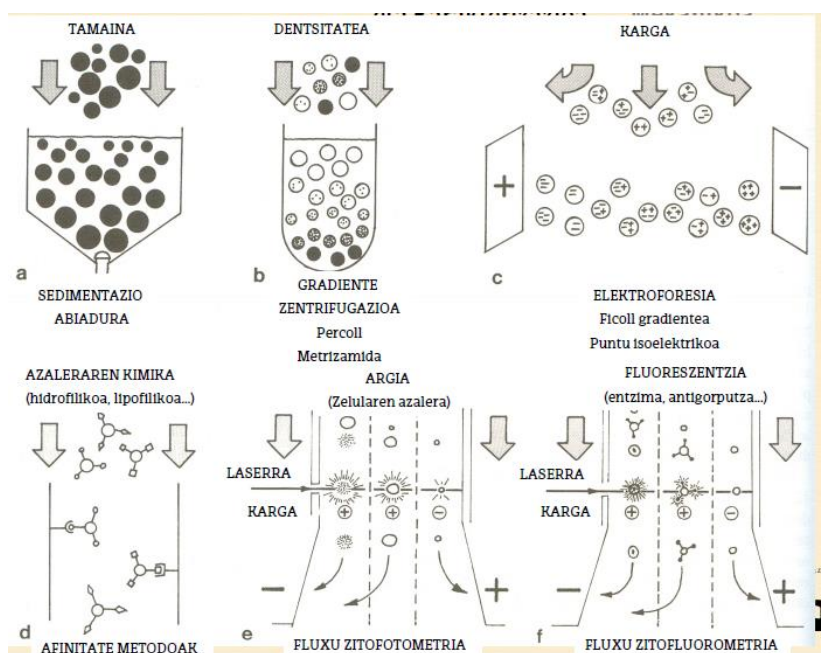
- Tamainaren arabera: sedimentazio abiadura aprobatxatu

- Dentsitatearen arabera: tamaina antzekoa bada, dentsitate gradiente bat erabili. Zelulak bereizteko dentsitatean oinarritu eta gure interesekoa hartu. **Gradiente zentrifugazioa** (percoll, metrizamida).

- Kargaren arabera: **elektroforesia** (Ficoll gradinetea, puntu isoelektrikoa)

- **Afinitate** metodoak: azaleraren kimika (hidrofilikoa, lipofilikoa...) den arabera, zelulak zutabeen lotuko dira.

- **Fluxu zitofotometria**: argia (zelularen azalera). Zelularen propietate berezi bat ezagutzen da aldez aurretik. Disoluzioaren tanta bat pasako da, zelula



bakarrarekin eta tamainaren arabera, laserrak karga bat edo beste emango die (handiak + eta txikiak -). Horren arabera banatuko dira.

- **Fluxu zitofluorometria:** Entzimak, antigorputzak. Gure interesko zelulak A proteina badu, horren aurkakoa den antigorputz markatua sartuko da laginean eta A proteinarekin lotzean fluoreszentzia igorriko du. Laserrean ezarriko da fluoreszentzia dutenei karga + edo - emateko. Horrela bereiztuko dira.

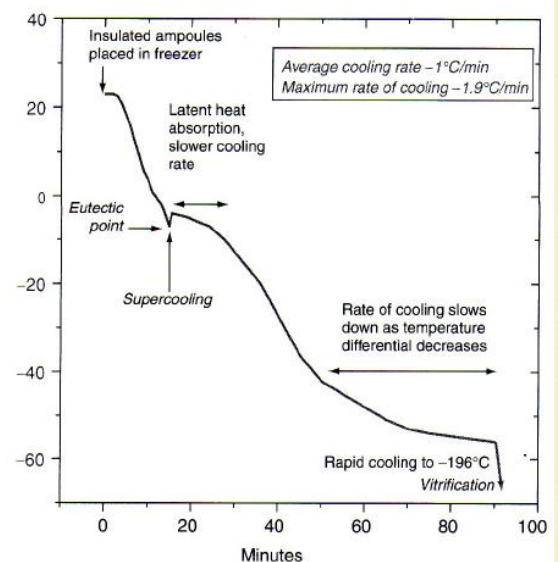
### 3. Mantenua

Ia ezinezkoa da hazkuntza zelularrak denbora luzean zehar mantentzea. Zelula horiek, momentu batean gorde egin behar dira. Gaur egun dagoen modurik onena zelulak mantentzeko izoztea da. Oso modu berezian.

Hazkuntza zelular gehienak urteak mantendu daitezke  $-130^{\circ}\text{C}$  baino baxuago mantentzen badira.

Kriobabespenaren **abantailak**:

- **Zelulen stock seguruen lorpena** (kutsadurarik gabekoak edota hutsegiteetatik babestuenak): Izoztutako zelulek seguru bat eskaini. Askotan behar baino zelula gehiago eskuratu eta batzuk gordetzen dira. Zu esperimientua egiten ari zaren zelula horietan kutsadura gertatu bada, zelula horiek erabili ditzakezu, zu lanean ari zaren zelulen berdina dena. Izoztuta dauden horiek ez daude kutsatuta eta modu erraz batean berreskuratu daitezke.
- Momentuan erabili behar ez diren hazkuntzetan **denbora, energia eta materialen aurrezpena**
- Zatiketa zelular mugatua duten **zelulen babesa**: Zelulak hayflick-en mugaraino zatitzen dira. Zelula horiek zenbat eta denbora gehiago matendu, orduan eta zatitzeko zailtasun handiagoak dituzte. Izoztuta dauden zelula horiek zatitzen ez direnez, ez da muga horretara iritsiko. Ezegonkortasun genetikoetatik edo presio selektibotik zelulak **babestea**: izoztea oso erabilgarria da lerro zelular jarraientzat. **Aneuploidiak** sortzen badira, zelula alaba horien artean, baten batek izan ditzake ezaugarri hobeak hasieran izan dugun zelula hori baino, oso azkar hasteko, medioa lortzeko erraztasunak... baina ezaugarri txarrak dituztenak ere ager daitezke.
- **Erreaktibo estandarrek eskuratzea** esperimientuetarako
- Izoztutako zelulak **berdinak** haien artean



Kriobabespen egokia egiteko kontutan hartu beharrekoa:

- Hazkuntza zelularrak ahalik eta **kontzentrazio altuenean** izoztu eta ahalik eta subhazkuntza gutxienetan. Gainera, zelula horien **biderakortasuna** gutxienez %90-ekoa izan behar da.
- Izozteko, zelulak **frasko handietan** sartzen dira eta zelulak zatitzen hasten dira, leku asko baitute. Zelula horiek ez dira beste frasko batzuetara pasatu eta anplifikatuko, zelula guztiak hartu behar dira. Gainera, ez direnez tripsinarekin kontaktuan egon ezta frasko desberdinetan banatzen joan, ez da haietan estres egoerarik agertu eta zelula kopuru oso handia da izozten dena.
- Izozketa **astiro** burutu behar da ( $1^{\circ}\text{C}$  minutuko)

- Hazkuntzaren izozketa burutuko den medioak beti **kriobabesle** bat izan behar du, **DMSO** edo **glizerola** %5-10-eko kontzentrazioan. Zelula motaren arabera kontzentrazio eta mota desberdinetan. Sakarosa ere erabili daiteke, baina honekin, ez da denbora luzez kriobabesten.
- Gutxi gora behera zelulen tenperatura  $-40^{\circ}\text{C}$  tara jaisten da. Horra heltzean nitrogeno likidora sartzen dira  $-196^{\circ}\text{C}$  tan. Momentu honetan erabaki behar da ea zelulak hor mantendu edo  $-60^{\circ}$  /  $-70^{\circ}\text{C}$  tartean mantentzen diren hozkailu batean sartuko diren. Zelulak denbora luzez  $-50^{\circ}\text{C}$  tik gora mantentzen badira, kaltetu egiten dira. Beraz zenbat eta denbora gehiago egon hortik gora, gero eta zelula kaltetu gehiago.
- Behin izoztuta daudela, zelulak  **$-70^{\circ}\text{C}$** -tan mantendu
- Beti **material esterila** erabili behar da: esporak oso ondo mantentzen dira  $-50^{\circ}\text{C}$  edo  $-60^{\circ}\text{C}$ -tan.

Izoztuta mantendu den hazkuntza zelularra ahalik eta azkarren giro tenperaturara ekarri behar da beraktibatzeke eta medio osoan konbinatu behar da (Roller fraskotan ahal bada).

Zelulak izozkailutik ( $\text{N}_2$  likidotik) hartu eta ahalik eta arinen frasko hori  $37^{\circ}\text{C}$  tan dagoen ur-bainuan jartzen da. Lehenago gehitutako glizerolaren bidez lortzen duguna, hemen sartzean proteinak eta gainerako molekulak ez desnaturalizatzea da. Bainua irabiatzen dago denbora osoan.

Bial oso txikitan egiten da prozesua bizkorrago gertatzeko. Behin desizoztuta, biala %70-eko alkoholarekin esterilizatzen da. Lagina, hazkuntza medioa duen zentrifugazio hodi batean jartzen da eta zentrifugatu egiten da (10 min  $125g$ ); izan ere, gainjalkinean geldituko diren glizerola eta DMSO, kutsagarriak izan daitezke giro tenperaturara eta, beraz, tenperatura aldaketaren jarraian kendu behar dira.

Ondoren, gure lagina hazkuntza frasko batean (T, pH eta medio egokia) jartzen da. Hazkuntza zelular gehienek biderakortasun baxua erakusten dute giro tenperaturara ekarri bezain laster, horregatik, zelula asko izoztu behar dira eta ahal bada, hauek biderakortasun handiena duten zelulak izatea komeni da. Lehen 24 orduetan, zelula ugari apoptosiz hiltzen dira. Momentu horretatik aurrera, irauten dutenak zatitzen eta baldintza berrietara ohitzen hasiko dira eta normalean hazkuntza berriz hasten da.

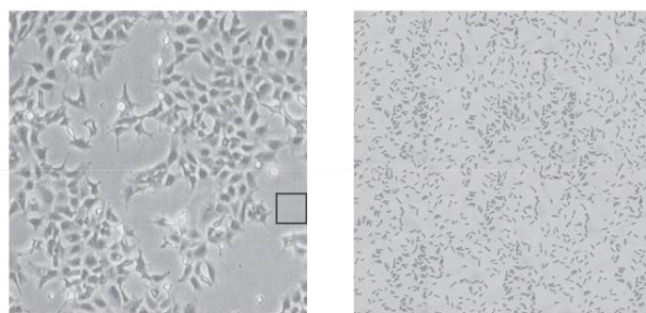
Zelulak 24 ordutara aztertu. Amaieran, izoztu ditugun zelulen %15-20 eskuratuko dugu.

## 4. Kutsadura

### 4.1 Bakterioak

Mikroorganismoen talde handi eta nonahikoa (leku ugartan aldi berean bizi dira) da. Tamaina txikikoak ( $\mu\text{m}$  gutxi) eta itxura oso aldakorrekoak dira. Beraien sakabanaketa eta hazkuntza tasa handia dela eta kutsadurarik ohikoena da.

Bakterioen bidezko kutsadura errez detektatzen da kutsadura gertatu eta egun gutxitara: hazkuntza uherrak (normalean gardena da, baina bakterioak daudenean ilundu) eta batzuetan geruza fin bat erakusten du. pH-aren jaitsiera azkarra, egun batetik bestera. Hazkuntza medioa arrosa izatetik horixka izatera pasatu. Mikroskopion zelulen artean ikus daitezke batzuetan egitura txiki mugikor bezala. Banaka zaila da, baina taldekapenak egiten dituzte zelulan artean.



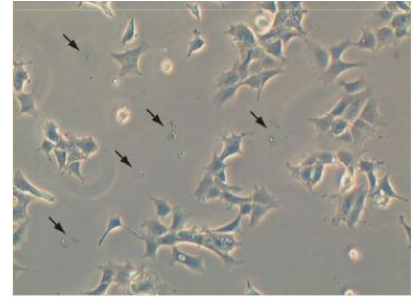
*E. Coli* bidezko kutsadura 293 zeluletan

### 4.2 Legamiak

Onddoen erreinuko unizelular eukariotikoak. Oso anitzak, tamaina oso aldakorrekoak (mikrometro gutxi- $40\mu\text{m}$  bitartean). Bakterioekin gertatzen den moduan, kutsadura gertatzen denean, medioa uherra

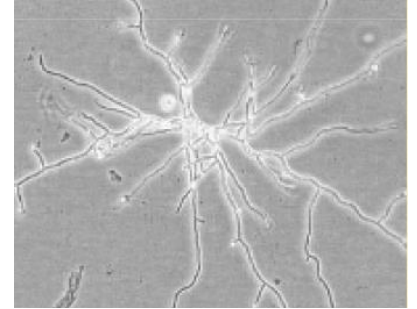


bilakatzen da (kutsadura maila altua denean), ez dutelako atxikitzeko ahalmena eta esekiduran mantentzen dira. pH-aren aldaketa txikia da (oso bortitza ez bada), beraz, hauen kutsadurak ez dira hain garrantzitsuak, pH-aren jaitsiera hazkuntza normal batean bezala gertatzen da. Gainera, ez dute medioa bakterioen bezain asko eta arin kontsumitzen. Legamiak itxura oboideko egitura indibidual gisa azaltzen dira



#### 4.3 Onddoak, lizuna

Onddoen erreinuko unizelular eukariotikoak dira. Egitura plurizelularrak eratzen dituzte, hifak, eta horregatik oso erraz identifikatzen dira mikroskopioan, oso egitura karakteristikoak. Kutsadura gertatzen denean, medioa uherra bilakatzen da (kutsadura maila altua denean) eta legamietan bezala pH-aren aldaketa txikia da (oso bortitza ez bada); elikagaien kontsumo eta pH jaitsiera gradualagoa.



Lizunek edo onddo batzuek eratzen dituzten esporak oso iraunkorrak eta erresistenteak dira. Izoztean ere mantenduko dira. Zelulak berriz ere baldintza egokietan jartzean, zelulen ehuneko handi bat hilko da baina esporak ez eta mantendu.

#### 4.4 Birusak

Agente mikroskopikoak dira. Oso txikiak eta oso zailak detektatzeko hazkuntza zelularretan eta baita bertatik garbitzeko ere. Oso txikiak dira, argi-mikroskopioan ikusezinak. Ez dute medioaren kontsumo handia egiten, medioa ez da uherrago egiten, pH-a ez da jaisten; baina zelulak hiltzen doaz. Birus gehienek hostalariarekiko oso espezifikoak direnez, ez dituzte beste espezie batzuen zeluletan eragiten. Detektatzeko, mikroskopia elektronikoa, immunotindaketan edo PCR bezalako teknikak beharrezkoak dira.

Gizakien HeLa zelulekin lan egiten bada, lagina birusekin kutsatu eta zientzialaria ere arriskuan. Hala ere, zaila da kutsadura hau agertzea.

#### 4.5 Mikoplasmak

Pareta zelula gabeko bakterioak dira. Oso txikiak dira eta detektatzeko zailak dira kutsadura handia izan arte, baina ez birusak bezain beste. Efektuak birusen antzekoak, uhertasunik ez, pH aldaketarik ez baina zelulak hiltzen joango dira. Detektatzeko, mikroskopia elektronikoa, immunotindaketan edo PCR bezalako teknikak beharrezkoak dira.



Oso ohikoa da mikoplasmak ikusteko tindaketa bereziak erabiltzea: adibidez, *Dapia* tindatzailea gehitzen zaio, hau fluoreszentea da eta DNARI lotzen zaio. Birusek ez dute DNA nahikoa baina mikoplasmek bai. Nukleoa tindatuta agertuko da eta zitoplasman, mitokondrioak ere, baina zelulen inguruan ere tindaketak agertuko dira.

### 5. Ohiko parametroak

Behin isolatutako populazio hori lortu dugula, zer neurtuko dugu?

#### 5.1 Zelulen kopurua

**Hemozitometroa:** Suspentsio zelularren kontzentrazioa ezagutzeko, azalera definitu batean zelulak kontatu eta gero kalkulatu da guztira zenbat zelula ditudan. Porta berezia, zenbait lerro markatuta, hauek azalera eta bolumen zehatz bat duten karratuak osatu.

**Metodo automatikoa:** Zelulak zulo txiki batean zehar pasarazten dira, zuloan zeharreko fluxua aldatuz joango da eta pultsu batzuk sortzen dira. Pultsu hauek sailkatu eta kontatzen dira. Laser baten bitartez neurtzen dira pultsu horiek, modu azkarra. Pultsu horiek adierazi tamaina nola aldatzen den...

## 5.2 Zelulen pisua

Oso gutxi erabiltzen da.

- $2,5 \times 10^8$  HeLa zelula/g pisu heze
- $8-10 \times 10^8$  leuzemia zelula/g pisu heze
- $1,8 \times 10^8$  giza fibroblasto/g pisu heze

## 5.3 DNA kopurua

Zenbait hazkuntzetan oso erabilgarria. Besteak beste, gure zelulen hazkuntzaren ploidia (zenbat kromosoma ditugun) berri ematen digu. Normalean DNA purifikatu egiten da eta DAPI edo Hoeshst bitartea DNA tindatzen da fluoreszentsia kalkulatuaz (260nm edo 492nm).

Aztertu daiteke ea gure baldintzek eraginik duten DNA gehiago izatean edo ez. Edo minbizi zelulak hazten ari bagara, oso azkar hazten dira, eta kontrola behar dute, DNA-n aldaketak. Luzaroan mantentzen den zelula hazkuntza bat badugu beharrezkoa da, izan ere, hasierako DNA hori mantentzen ez bada, minbizi zelula bihurtu denaren seinale.

## 5.4 Proteina kopurua

Baita ere oso erabilia. Baita ere oso erabilia. Aldez aurretik homogenizatutako zelulak erabiltzen dira eta **Bradford** edo **Lowry** teknika kolorimetrikoak erabiliz kalkulatu da ea tratamenduaren ondorioz proteina kopurua aldatu den edo ez.

## 5.5 Zelulen biderakortasuna

Teknika desberdinak daude:

- **Tripan urdina** tindatzaile organikoa da. Hau zelulen barnealdean sartzen da eta zelulek kanporatu. Bizirik daudenek gaitasuna dute kanporatzeko, baina hilda daudenek ez. Horregatik, zelula zuri eta urdinak agertu.
- **MTT testa:** jarduera mitokondrialean oinarritzen da. Eukarioto guztiek mitokondrioak behar dituzte aktibo, bizirik egoteko. Gure zelulen esekidura substratu batekin kontaktuan jartzen da, mitokondrioko zenbait entzimekin erreakzionatu (edo barne mintzeko proteinekin lotzen den molekula organiko bat erabiltzen da) eta fluoreszentsia ematen dute, beti ere zelulak bizirik badaude.
- **ADCC testa:** aurrekoaren antzekoa

## 5.6 Kolonien efizientzia

Kolagena sintetizatzeke efizientzia adibidez. Ea beraien funtzioa modu normalean betetzen duten ikusi.

## 6. Adibideak

(a) Osagai molekular urriak edo zelula-mota baten espezifikoak direnak karakterizatzeko (zelulen populazio homogeneo eta handien -kultiboan proliferatu ondoren- azterketa biokimikoa, ...). Oso espezifikoa den molekula baten ekoizpena ziurtatu. In vitro teknikak hemen erabilienak.

(b) Zitofisiologiazko ikerketetan (adibidez, higidura zelularra, fagozitosia, ...)

- (c) In vitro toxizitatearen saiakuntzan (farmakoen, elikagaien gehigarrien zein kutsatzaileen arriskua ebaluatzeko). Zelulak zelak mugitzen diren...
- (d) akats kromosomikoen detekzio goiztiarrean (amnioseko zelulak kultibatzen dira)
- (e) antigorputzen ekoizpen industrial eta klinikoan (kultibaturiko zelula somatikoen hibridazioen bidez)
- (f) klonen ekoizpenean (ikerketa biomedikoan gero eta gehiago erabilia);
- (g) geneak zelulaz-zelula transferitzeko (injinerutza genetikoan erabilia).

## 7. Desberdintzapena

Hazkuntza zelularren mugei edo baliokortasuna.

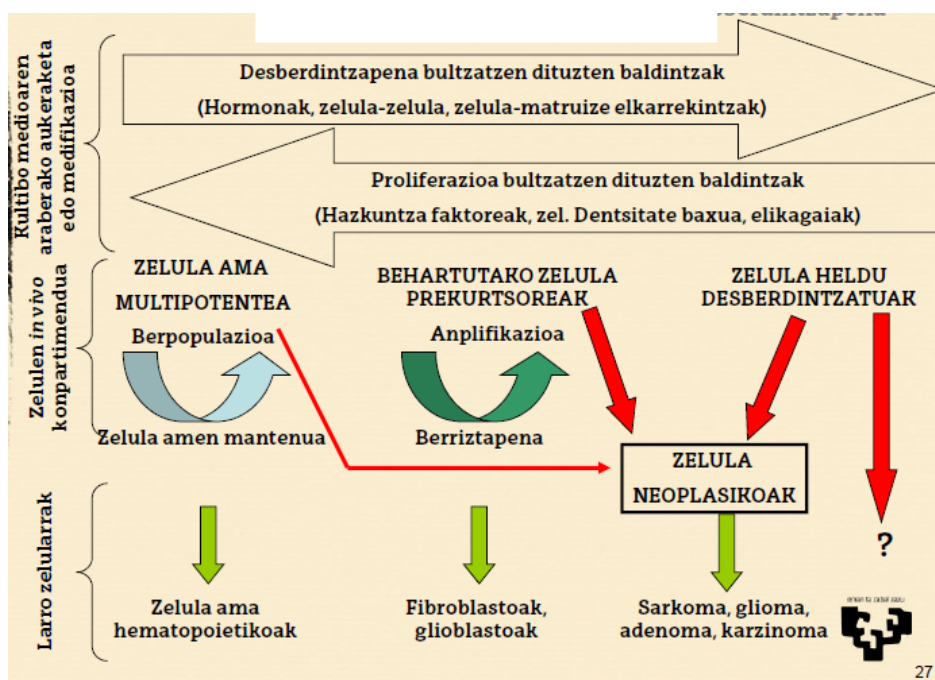
Normalean hazkuntza zelular bat zelula mota jakin batekin. Zelula hori zatituz joango da, baina zelulak zenbat eta desberdintzatuago egon, zelulen zatitzeko ahalmena gero eta txikiagoa da. Adibidez, globulu gorriak hain desberdintzatuta daudenez, ez dute nukleorik eta ez dira zatitzen. Neuronen kasuan gauza bera gertatzen da, oso morfologia garatua dute.

Zelula espezializatuekin lan egiten bada, zelula horiek muga betatara heltzean, ez dira zatituko edo arazo asko izango dituzte zatitzeko. Beraietatik eskuratzen den proliferazioa oso baxua. Zelula hauen kasuan, oso zelula kopuru mugatua baina funtzionaltasuna eta berezitasunak aztertzei aukera izango dugu.

Erdibideko hazkuntza zelularren kasuan, anplifikatzeko gaitasuna eta berriztatzei gaitasuna izango dituzte. Oso desberdintzapen maila baxuko zelulak.

Aldiz zelula amak oso azkar eta asko zatitzen dira, baina beraien funtzionaltasuna ez dago definituta. Beraien funtzio bakarra zatitzea da eta gero hasten dira desberdintzaten. Zelula ama multi/pluri potenteak dira baina ez dituzte zure intereseko ezaugarri horiek eskaintzen, ez dago definituta. Honek populazioa asko handitzea eskaintzen du eta populazio handia lortuko da, Hori da aztertu daitekeena.

Bai seinaleen zein aldaketen aurrean espero diren erantzun motak zelula motaren arabera aldatuko dira. Eta argi eduki behar da zein zelula motarekin hasten zaren lanean, ezin baituzu aztertu funtzioen desberdintzapena zelula ama hazkuntza erraldoi bat aztertzen ari bazara.





**Des-desberdintzapena:** Zelularen ezaugarri espezializatuak galdu egiten dira zelulak fenotipo “primitiboagoak” eskuratzen dituztelarik. Zelula desberdintzatuak, zelula ama bihurtzea zenbait gene isilaraziak aktibatuz.

**Des-adaptazioa:** Produktu espezifikoaren ekoizpena edota funtzio espezializatuen bestelako aspektu batzuk hainbat faktoreen (hormonak, zelula-zelula, zelula-matrizea interakzioak...) pean dago.

**Selekzioa:** Zelulen ezaugarrietan oinarrituz, baliagarrienak diren zelulak aukeratzen dira.

