



Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento

Apellidos, nombre	Gallego Albiach, Victor (vicgalal@upvnet.upv.es) Pérez Igualada, Luz María (mlpereig@upv.es)
Departamento	Instituto de Ciencia y Tecnología Animal
Centro	Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

En este artículo vamos a explicar cómo **estimar la densidad de células y/o partículas** en una suspensión mediante el uso de diferentes tipos de cámaras de recuento. El conteo de partículas es una técnica ampliamente utilizada en una gran cantidad de ramas como la biotecnología, biomedicina, producción animal, producción vegetal, etc. por lo que la comprensión y el desarrollo de este proceso permitirá al alumno poder aplicarla en diferentes etapas y procedimientos.

2 Objetivos

A través de la lectura y comprensión de este documento el alumno será capaz de:

- Calcular la densidad de diferentes tipos de partículas por unidad de volumen en una suspensión
- Utilizar diferentes modelos de cámaras de recuento para la estimación de dichas densidades
- Aplicar los resultados obtenidos en distintos procesos biotecnológicos o biomédicos

3 Introducción

El contaje de partículas se presenta como una herramienta de gran utilidad que puede aplicarse en una gran cantidad de procesos relacionados con la biotecnología, biomedicina, producción animal o producción vegetal [\[1\]](#). Pero os preguntareis... ¿qué aplicación tiene exactamente? ¿para qué sirve realmente? Pues bien, gracias al contaje de determinadas células podemos conocer cosas tan interesantes como:



¡Saber si estamos enfermos o si padecemos algún tipo de infección! En este caso, los hospitales se encargan de contar la cantidad de glóbulos blancos presentes en una muestra de sangre, si hay muchos... algo va mal.



Saber cuánta levadura tenemos que añadir en una receta determinada para conseguir un buen pastel (vosotros normalmente añadís la cantidad de levadura que dice la receta, pero... ¡la empresa que nos vende esa levadura sabe exactamente la cantidad de esas bacterias (levaduras) que estamos añadiendo!)



¡Saber el grado de degradación que sufre un río, un lago o l'Albufera de Valencia! En este caso, un simple conteo de la cantidad de fitoplancton (microalgas) existente en una muestra de agua recogida del ecosistema puede decirnos el grado de eutrofización (degradación) del mismo.

Como habéis podido comprobar, el contaje celular puede aplicarse en una gran cantidad de procesos, y algunos de ellos pueden resultar incluso cercanos o familiares para muchos de vosotros (análisis de sangre, hacer un bizcocho, etc.). Ahora bien, la siguiente pregunta que nos hacemos es **¿cómo se hace? ¿cómo se lleva a cabo ese conteo celular?**

4 Desarrollo

La estimación de la densidad celular puede llevarse a cabo a través de diferentes métodos o técnicas [2], entre los que podemos destacar *i)* el recuento celular a través del microscopio, *ii)* el recuento celular a través de contadores de partículas automáticos (citometría de flujo), *iii)* la determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría y, finalmente, *iv)* la cuantificación de la biomasa en peso seco.

De todos estos métodos, el **recuento celular mediante microscopía óptica** es la técnica más utilizada para estimar la densidad celular, ya que es un método sencillo y poco costoso (económicamente hablando). Sin embargo, es un método que resulta algo tedioso en su faceta instrumental, por lo que no suele generar resultados aceptables hasta que se adquiere la destreza necesaria en el laboratorio. Además, el proceso de recuento celular consta de una serie de fases (Figura 1) que explicaremos en las siguientes secciones de manera detallada.

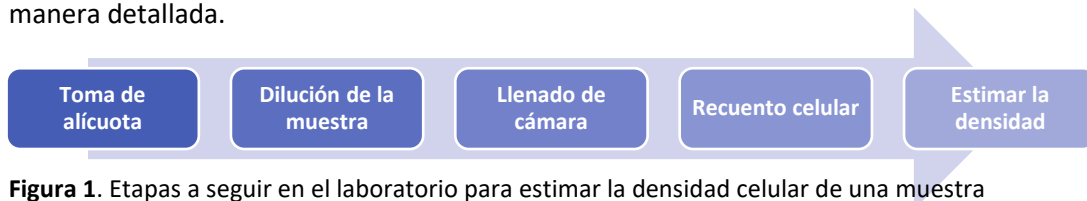


Figura 1. Etapas a seguir en el laboratorio para estimar la densidad celular de una muestra

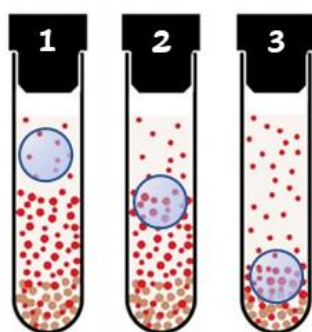
4.1 Toma de alícuota (toma de muestra representativa)

Aunque parezca un proceso trivial, la toma de alícuota (muestra representativa) es una etapa delicada dentro del proceso de conteo celular, ya que la elección de una “alícuota” no representativa puede generar resultados engañosos. Vamos a verlo con un ejemplo:

*A un investigador le han encargado el análisis del agua de una zona determinada del lago de l’Albufera. Para ello, el investigador se dirige a esa zona y toma 3 muestras (réplicas) de un mismo punto (Figura 2). Con el objetivo de estimar la densidad de fitoplancton (pequeñas células vegetales) existente en las muestras, el investigador coge con una pipeta una alícuota de cada tubo (círculo azul) para realizar el correspondiente conteo celular. **Cuando acaba todo el proceso, el investigador se da cuenta de que cada muestra analizada presenta una densidad diferente!!!***



¿Te atreves a decir por qué le ha sucedido esto observando la imagen de la figura?
¿Va a tener el investigador que repetir el trabajo? ¿el de campo o el de laboratorio?



Realmente han sucedido 2 eventos críticos a evitar en durante el proceso de toma de alícuotas:

- i. La alícuota en cada muestra se ha tomado a una altura diferente
- ii. Las muestras no estaban correctamente homogenizadas en el momento de coger la alícuota

Por tanto... el investigador debe de repetir el trabajo de laboratorio, aunque no es necesario que vuelva al lago a tomar nuevas muestras

Figura 2. Diferentes muestras tomadas de un mismo punto en el lago de l’Albufera

4.2 Dilución de la muestra

Muchas veces sucede que la muestra original que obtenemos en el campo o en el laboratorio presenta una **densidad celular excesivamente elevada**, y es prácticamente inviable realizar un conteo celular en estas condiciones. Es por ello que, ante este tipo de situaciones, las muestras originales deben diluirse en el laboratorio en un proceso previo al conteo celular.



¿Te imaginas cómo se hace esta dilución? ¿Cuánto tengo que diluir la muestra original? o ¿en qué medio tengo que diluir la muestra?

La primera de estas cuestiones tiene una respuesta directa: la dilución de la muestra se llevará a cabo mediante el método conocido como **diluciones seriadas** [3]. En este tipo de diluciones se parte de una muestra original y se preparan series de diluciones al décimo (1:10) o al medio (1:2) en un buffer (solución tampón) específico.

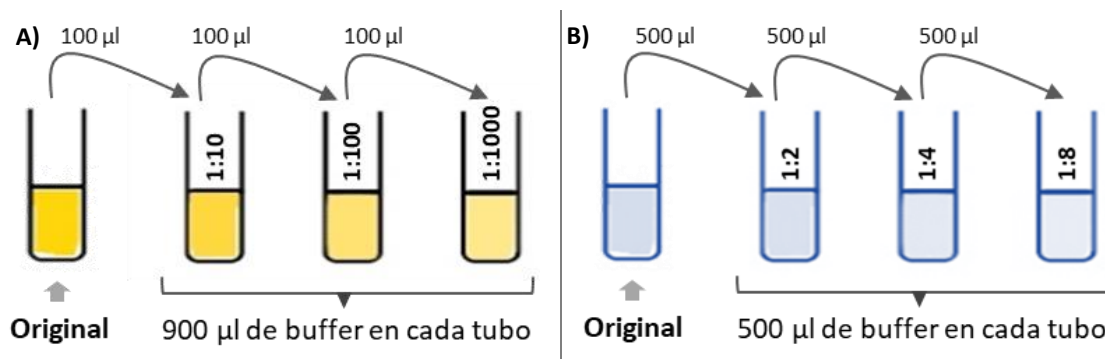


Figura 3. Esquema de una dilución seriada. A) Factor de 10 o a la décima parte (1:10, 1:100, 1:1000, etc.), B) Factor de 2 o al medio (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 etc.).

En relación con la segunda pregunta, ¿Cuánto tengo que diluir la muestra original?, **la respuesta es depende** (depende de cuan concentrada estuviera la muestra original). En este sentido, es importante tener en cuenta que si realizo una dilución muy pequeña todavía voy a tener que contar una gran cantidad de células (mucho tiempo invertido) y, por otra parte, si la diluyo la muestra en exceso las posibilidades de cometer un error son más grandes en términos de varianza experimental.

Finalmente, y en relación con la última pregunta, la muestra habrá que diluirla en un medio similar (buffer) a donde se encontraban suspendidas las células en el medio original. En este sentido podemos ver algunos ejemplo en la siguiente figura.

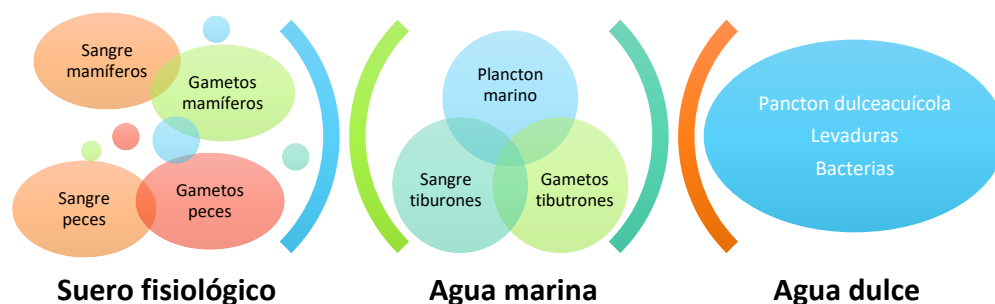
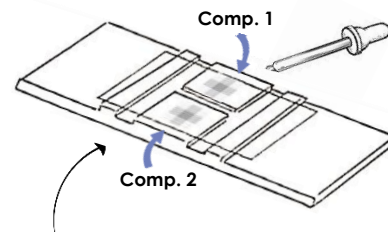


Figura 4. Medios de dilución más utilizados para resuspender diferentes tipos de muestras biológicas

4.3 Llenado de la cámara de recuento

Una vez tenemos la muestra original diluida a un factor que consideremos que puede ser apropiado para su análisis (para esto la experiencia será un grado!!), estamos en condiciones de poder cargar la cámara de recuento. En el mercado existe una gran variedad de cámaras de recuento (también conocidas como hemocitómetros), pero el funcionamiento es básicamente el mismo para todas ellas. Veamos cómo es y cómo se carga una cámara de recuento en la siguiente secuencia:

- i. Coloca un cubre de cristal que tape el compartimento 1 y 2
- ii. Pipetea 20 μ l de la muestra previamente diluida (preparada en el punto 4.2)
- iii. Coloca la pipeta en uno de los bordes y libera la dilución poco a poco hasta que se llene uno de los dos compartimentos
- iv. Repite el mismo proceso (b + c) en el otro lado de la cámara y llena el otro compartimento
- v. Deja reposar la suspensión un par de minutos



Cámara de recuento o hemocitómetro

4.4 Recuento o contaje celular

Una vez que la muestra ha sedimentado, colocamos la cámara bajo el microscopio e intentamos encontrar (con pocos aumentos, 10x) uno de los dos compartimentos (Figura 5). Una vez localizado, cambiar a 20x o 40x y localizar el área que se desea contar. Si hemos realizado todos los pasos de manera correcta (toma de alícuota, dilución y llenado), deberíamos de observar células en suspensión como en la imagen a 40x Figura 5.

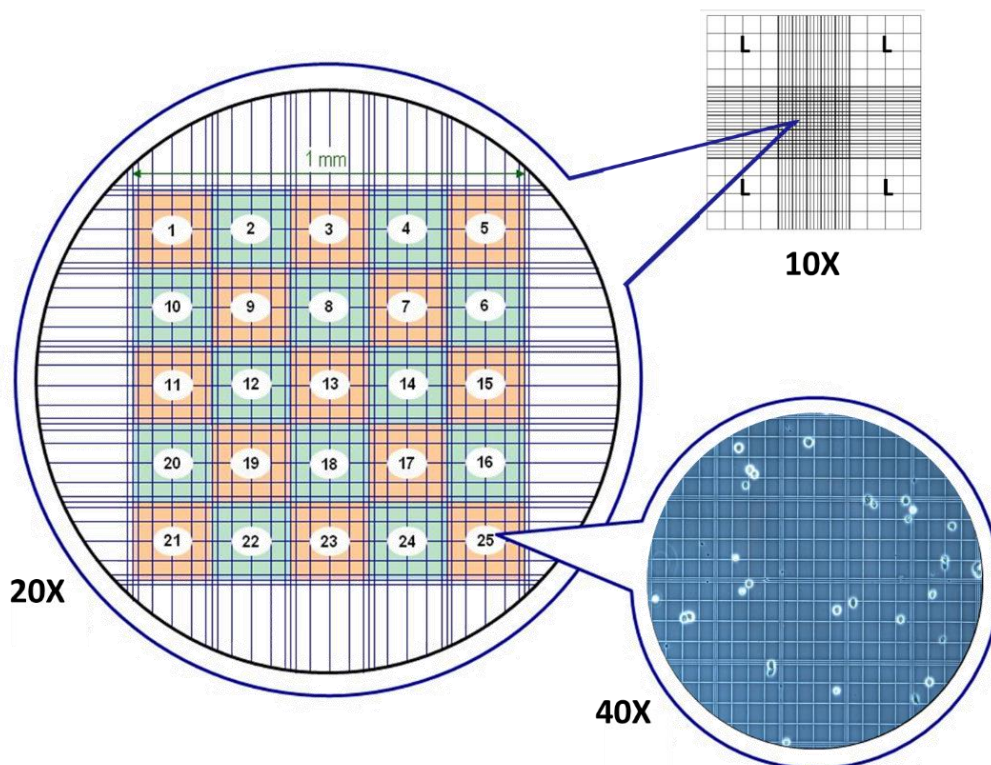


Figura 5. Aspecto del compartimento de conteo en una cámara de recuento (*Neubauer improved*)

Como habrás podido observar, en cada uno de los compartimentos de recuento de la cámara existen multitud de cuadrados y, además, cada uno de ellos tiene diferente tamaño. Vamos a explicarlo en detalle y a verlo gráficamente en un modelo genérico (Figura 6)

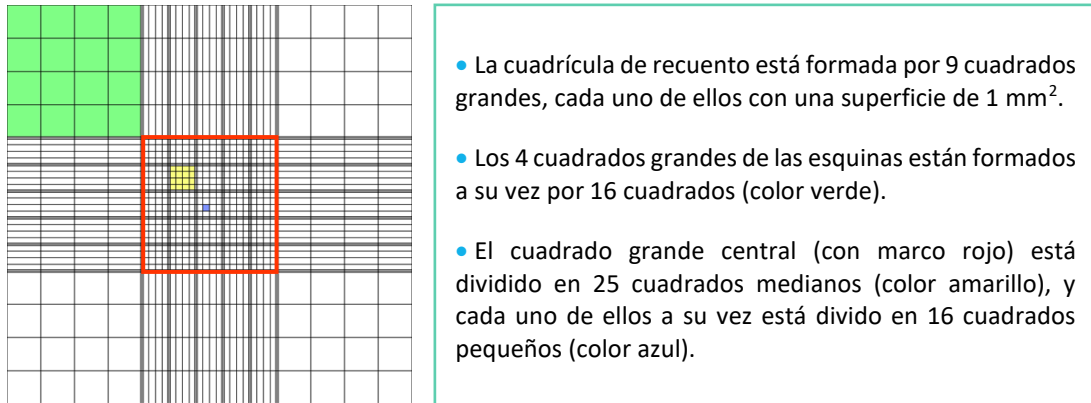
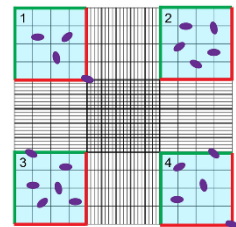


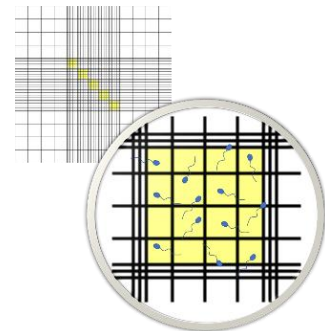
Figura 6. Aspecto del compartimento de conteo en una cámara de recuento (*Neubauer improved*)

El conteo celular se puede realizar tanto en el cuadrado grande central (a 40x) como en los 4 cuadrados grandes de las esquinas (a 20x), y todo dependerá del tamaño de las células que vayamos a analizar (fitoplancton, glóbulos rojos, glóbulos blancos, espermatozoides, etc.). Para entenderlo mejor, vamos a ver un ejemplo práctico para cada caso:

Ejemplo A. Recuento de glóbulos blancos. Dado que los glóbulos blancos son células de un gran tamaño, su conteo se suele llevar a cabo a 20 aumentos utilizando los 4 cuadrados grandes de los hemocitómetros. En la imagen de la derecha vemos que en el conteo hemos obtenido un total de **18 glóbulos**. No hemos incluido aquellos que tocaban la línea inferior o derecha (remarcada en rojo), pero sí los que tocaban la línea superior e izquierda (remarcada en verde)



Ejemplo B. Recuento de espermatozoides. Debido a que los espermatozoides son generalmente células pequeñas, su conteo se suele llevar a cabo a 40x utilizando el cuadrado central. De los 25 cuadrados medianos que conforman el cuadrado central, se suelen contar las células que se encuentran dentro de 5 cuadrados que forman una diagonal (imagen de la derecha). En este ejemplo, uno de los cuadrados medianos que hemos contado contenía **11 espermatozoides**. Al igual que en el ejemplo anterior, no hemos incluido los espermatozoides que tocaban la línea inferior y derecha (2), pero sí los que tocaban la línea superior e izquierda (1). ¡Recuerda que nos faltarían por contar aún 4 cuadrados para completar los 5!



Es importante remarcar que si tengo una elevada cantidad de células para contar, lo mejor sería realizar de nuevo una dilución (ver apartado 4.2) con el fin de evitar errores (dobles conteos, etc.)



4.5 Cálculo o estimación de la densidad celular

Ahora que ya sabemos contar el número de células que tenemos en el compartimento de conteo del hemocitómetro, **¿cómo sabemos la densidad de la muestra original?**

¡Y aquí entran las matemáticas!! Realmente el parámetro de la densidad no es más que la magnitud que expresa la relación entre la masa (o número) y el volumen de un cuerpo o sustancia. En este sentido, el primer factor ya lo conocemos (que es el número de células que hemos contado) pero... **¿y el volumen?**

Pues el volumen donde hemos realizado ese conteo viene especificado en las instrucciones de cada cámara de recuento o hemocitómetro. Aunque suelen seguir un patrón similar, cada cámara presenta un tamaño específico, por lo que para realizar el cálculo final de la densidad celular siempre deberemos recurrir a la especificaciones de cada modelo. No obstante, vamos a ver un ejemplo genérico de cómo se realiza este cálculo, donde vamos a tomar como base los dos conteos del apartado anterior (glóbulos blancos y espermatozoides).

$$\text{Densidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad (mm)} \times \text{Dilución}}$$

Ejemplo A. Recuento de glóbulos blancos

- Células contadas: 18 glóbulos blancos
- Superficie de recuento: 4 mm² (4 cuadrados de 1mm² cada uno)
- Profundidad de la cámara: 0.1 mm
- Dilución: 1:50

Al aplicar la fórmula universal tenemos que:

$$\text{Densidad} = \frac{18 \text{ glóbulos}}{4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times \frac{1}{50}} = 225 \text{ glóbulos/mm}^3 = 2.25 \times 10^6 \text{ glóbulos/mL}$$

Ejemplo B. Recuento de espermatozoides

- Células contadas: 11 espermatozoides
- Superficie de recuento: 0.04 mm² (1 cuadrados medianos de 1mm² cada uno)
- Profundidad de la cámara: 0.1 mm
- Dilución: 1:200

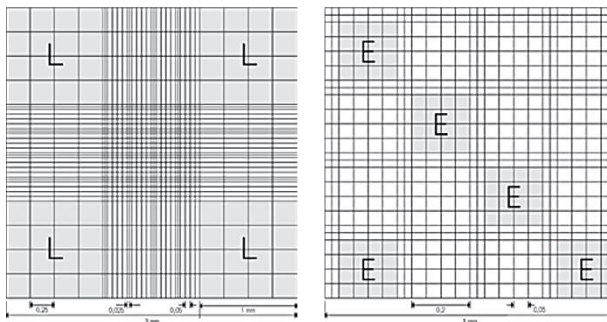
Al aplicar la fórmula universal tenemos que:

$$\text{Densidad} = \frac{11 \text{ espermatozoides}}{0.04 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times \frac{1}{200}} = 5.5 \times 10^5 \text{ esp./mm}^3 = 5.5 \times 10^9 \text{ esp./mL}$$

4.6 Tipos de cámaras de conteo o hemocitómetros

Hemos visto como sabiendo el número de células contadas en un volumen conocido, puedo calcular la densidad original de una muestra aplicando una fórmula genérica. Sin embargo, en el mercado existen una amplia variedad de hemocitómetros y cada modelo puede presentar un diseño específico con pequeñas variaciones (número de cuadrados, tamaño de estos, etc.). Por tanto, en los siguientes subapartados se muestran 3 de los modelos más utilizados en el mercado con un resumen de los pasos a seguir para estimar densidades celulares en cada uno de ellos [\[4\]](#).

4.6.1 Cámara Neubauer

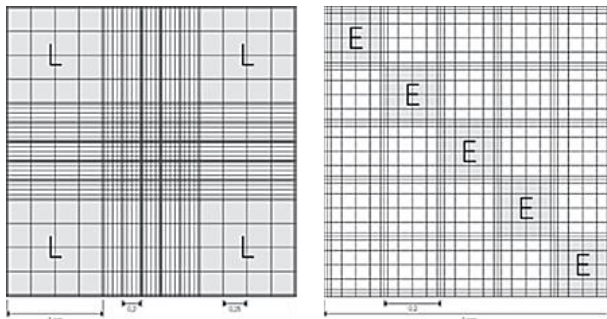


Cuadrícula de recuento (3x3 mm) dividida en 9 cuadrados grandes de 1 mm de arista. Los 4 cuadrados grandes de las esquinas (L) tienen una superficie de 1mm² y están divididos a su vez en 16 cuadrados medianos (0.25 mm de lado)

Cuadrado grande central dividido en 16 cuadrados medianos con aristas de 0.20 mm (y estos a su vez divididos en 16 cuadrados con aristas de 0.05 mm).

Los 4 cuadrados grandes (L) de las esquinas se utilizan para contar células grandes (p.ej. leucocitos), mientras que los 5 cuadrados medianos (E) se utilizan para contar células de pequeño tamaño (p.ej. eritrocitos, espermatozoides, etc.)

4.6.2 Cámara Neubauer improved

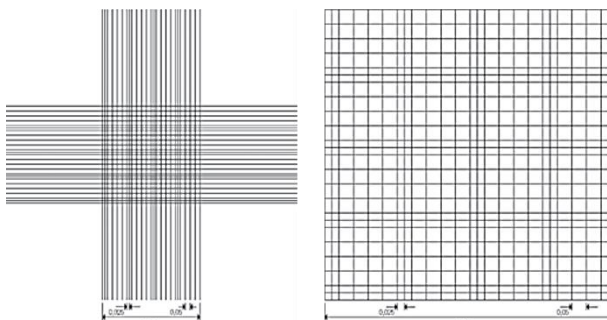


Cuadrícula de recuento (3x3 mm) dividida en 9 cuadrados grandes de 1 mm de arista. Los 4 cuadrados grandes de las esquinas (L) tienen una superficie de 1mm² y están divididos a su vez en 16 cuadrados medianos (0.25 mm de lado)

Cuadrado grande central dividido en 25 cuadrados medianos con aristas de 0.20 mm (y estos a su vez divididos en 16 cuadrados con aristas de 0.05 mm).

Los 4 cuadrados grandes (L) de las esquinas se utilizan para contar células grandes (p.ej. leucocitos), mientras que los 5 cuadrados medianos (E) se utilizan para contar células de pequeño tamaño (p.ej. eritrocitos, espermatozoides, etc.)

4.6.3 Cámara Thoma



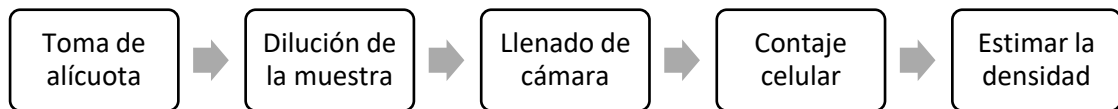
La cuadrícula de recuento cooresponde con la cuadrícula central de la Neubauer (1x1 mm)

Cuadrado grande central dividido en 16 cuadrados medianos con aristas de 0.20 mm (y estos a su vez divididos en 16 cuadrados con aristas de 0.05 mm).

No presenta cuadrados grandes exteriores, por lo que las cámaras Thoma solo se utilizan para recuento de células de pequeño tamaño (p.ej. eritrocitos, fitoplancton, etc.)

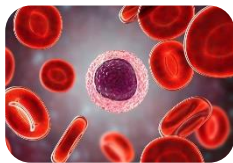
5 Conclusiones

A lo largo de este artículo docente hemos visto como estimar la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. A pesar de ser un método simple y económico, también hemos visto que resulta algo tedioso en su faceta instrumental, y es importante desarrollar cada una de las etapas de manera meticulosa



Para ver cómo se desarrolla todo este proceso de manera práctica y visual, la revista “*Journal of Visualized Experiments*” ofrece un artículo con un video desarrollando de manera detallada todas las etapas del proceso que hemos ido viendo durante este artículo [5]. [¡Échale un ojo para reforzar todos los conceptos que has ido aprendiendo!!](#)

Es importante recordar que la estimación de la densidad celular es una herramienta muy utilizada en una gran cantidad de procesos relacionados con la biotecnología, biomedicina, producción animal, producción vegetal..., con aplicaciones eminentemente prácticas como:



Análisis de sangre



Elaboración de alimentos



Técnicas de Reproducción Asistida



Análisis de calidad del agua

6 Bibliografía

- [1] Hoffman, T. L. Counting cells. In Cell Biology. Ed. Academic Press. 2006, pp 21-24.
- [2] Camacho-Fernández, C.; Hervás, D.; Rivas-Sendra, A.; Marín, M. P. & Seguí-Simarro, J. M. Comparison of six different methods to calculate cell densities. Plant methods, 2018, vol. 14, no 1, p. 30.
- [3] JoVE Science Education Database. Microbiology. Serial Dilutions and Plating: Microbial Enumeration. JoVE, Cambridge, MA, 2020.
- [4] Cámaras de recuento. Disponible en: <https://tinyurl.com/Tipos-de-camaras-de-recuento>
- [5] JoVE Science Education Database. Métodos Básicos en Biología Celular y Molecular. Usando un hemocitómetro para conteo de células. JoVE, Cambridge, MA, 2020.