

2ª Edición



Manual de Prácticas

y texto guía con conceptos teóricos para

Bases de Biología Celular

Universidad de Guadalajara, CUCI-UdG



Zaira López

Peter Knauth

María Guadalupe Ávila

Prólogo del Texto

Este manual de prácticas y guía texto está dirigido a los estudiantes del primer semestre de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo del Centro Universitario de la Ciénega de la Universidad de Guadalajara. En éste manual se recopilan prácticas experimentales de acuerdo al conocimiento y habilidad del estudiante; en ellas se reafirma gran parte de la teoría de la materia de Bases de Biología Celular. Las prácticas aquí descritas han sido implementadas de acuerdo a los temas contenidos en el programa de la materia, a la habilidad de los estudiantes dado que provienen de diferentes bachilleratos, donde algunos realizan pocas prácticas y otros no lo hacen. Por otra parte se toma en cuenta la infraestructura y los consumibles del laboratorio donde normalmente se realizan estas prácticas. Cada una es descrita por un texto introductorio que explica el fundamento del objetivo de la práctica, así como se detalla paso a paso el procedimiento, por lo tanto cada práctica contempla: a) el uso de un instrumento de uso frecuente durante la carrera profesional, b) la descripción de diferentes tinciones para la observación de células eucariota y procariota, así como observación de tejidos, c) la descripción del comportamiento de células eucariotas o procariotas en diferentes medios, d) las formas correctas de desechar los residuos biológicos y e) un anexo donde se describen cantidades y procedimientos para preparar medios de cultivo, soluciones químicas y colorantes. El estudiante al realizar todas las prácticas de este manual deberá obtener habilidad y destreza para trabajar en un laboratorio de Ciencias Biológicas. Por otra parte en el manual existen términos y abreviaciones en inglés, que los autores consideramos no traducirlos debido a que son terminologías internacionales muy conocidas y muy difícilmente existirá una traducción al español igual o mayormente conocida que en inglés.

Índice

Prólogo del Texto	I
Índice	II
Abreviaciones	III
Reglamento del Laboratorio	IV
Bioseguridad	1
Preparación de un banco de diluciones y uso del espectrofotómetro	9
Partes del microscopio: observación de células y tejidos	16
Fijación y tinción de células eucariotas	23
Fijación y tinción de células procariotas	31
Observación de estructuras internas de células eucariotas	40
Comportamiento de células eucariotas frente a soluciones con diferente osmolaridad y a diferentes temperaturas	47
Ciclo celular: mitosis en células vegetales	55

Abreviaciones

Abs	Absorbancia
<i>A. dest.</i>	Aqua destillatum (agua destilada)
BSL	Biosafety Level (nivel de bioseguridad)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DPX	Di-n-butyl-Phthalate in Xylene (di-n-butil-ftalato en xileno)
EM	Erlenmeyer
GLP	Good Laboratory Practice (buenas prácticas del laboratorio)
GMO	Genetically Modified Organism (organismo genéticamente modificado)
HEPA	High-efficiency Particulate Air (filtro de aire de alta eficiencia)
HHS	U.S. Department of Health and Human Services (Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus de la inmunodeficiencia humana, VIH)
LB	Lysogeny Broth
N.A.	Numeric Aperture (apertura numérica)
NB	Nutrient Broth (caldo nutritivo)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (buffer fosfato salino)
PDB	Potato Dextrose Broth
rER	rough Endoplasmatic Reticulum (retículo endoplasmático rugoso)
RG	Risk Group (grupo de riesgo)
RI	Refractive Index (índice de refracción)
rpm	revolutions per minute (revoluciones por minuto)
soln	solución
TSB	Tryptic Soy Broth (caldo soya tripticasa)
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS)

Reglamento del Laboratorio

Protección Personal

1. Usar batas limpias o uniformes especiales en todas las prácticas.
2. Está prohibido usar las batas o uniformes fuera del laboratorio, p. ej. en aulas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal, baños etc.



3. Usar calzado cerrado, de preferencia de piel, seguro para caminar (no zapatos deportivos, sandalias, zapatillas, zapatos con tacón alto).



4. Usar guantes protectores apropiados para los procedimientos que entrañan contacto directo o accidental con reactivos peligrosos o materiales biológicos infecciosos.



Uso de guantes:

- Revisar los guantes visualmente antes del uso (existencia de agujeros)
- No tocar con guantes objetos fuera del experimento (p.ej. teléfono, teclado, equipos, puertas, grifería) para evitar la distribución del contaminante
- Cambiar guantes contaminados inmediatamente!
- No usar guantes por mucho tiempo (daña la piel)
- Desprenderse de los guantes de manera *inside out* (de 'dentro a fuera')
- Desechar asépticamente guantes contaminados con agentes biológicos infecciosos
- Después del uso, lavarse bien las manos y ponerse crema para piel
- * No existen guantes universales, que protegen contra todo
- * Guantes desechables tienen una sola cierta resistencia contra reactivos



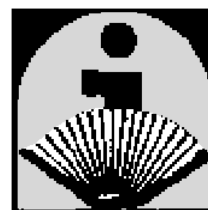
5. Usar gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos para proteger los ojos y el rostro contra salpicaduras, impactos o radiación cuando es indicado.



Reglas Generales de Comportamiento en el Laboratorio

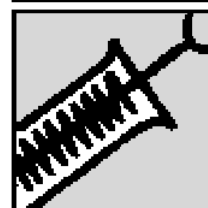
1. Es obligatorio informarse sobre los riesgos específicos de sustancias peligrosas y/o material biológico infeccioso.

Véase: <http://radio.cuci.udg.mx/bch/ES/Sicherheit/index.html>



2. Hay que mantener el laboratorio limpio y ordenado:

- al material usado (p.ej. quitar escrituras y adhesivos)
- a los equipos (p.ej. limpiar centrífuga o balanza después de su uso)
- el lugar de trabajo y lugares comunes (p.ej. campana, lavabo)



3. Las superficies de trabajo se limpian antes y al final de cada jornada. Además, se descontamina inmediatamente de todo derrame de material potencialmente peligroso.

4. El laboratorio debe ser libre de materiales no relacionados con el trabajo (p.ej. bolsas, mochilas).

5. Hay que mantener ¡Siempre! libres las salidas de emergencias

6. Hay que avisar a los responsables situaciones peligrosas y/o mal funcionamiento de equipos.



7. Está prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.

8. Está prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano.

9. Celulares deben ser apagados.



10. Está prohibido correr o jugar.

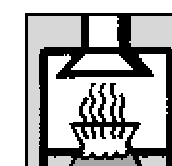
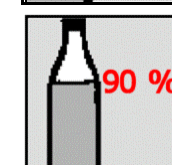
11. Está prohibido usar equipos sin instrucción previa por el responsable respectivo.

12. Hay que lavarse las manos después de manipular reactivos, animales y/o materiales biológicos, y antes de abandonar las zonas de trabajo.



Reglas Especiales de Comportamiento en el Laboratorio

1. Está estrictamente prohibido pipetear con la boca.
2. Está prohibido colocarse materiales en la boca, pasar etiquetas por la lengua, tocarse la cara con manos contaminadas (especialmente ojos).
3. Cualquier derrame o accidente con sustancias peligrosas y/o materiales infecciosos se comunica al responsable del laboratorio. Se mantiene un registro escrito de esos accidentes e incidentes.
4. Materiales contaminados hay que descontaminar antes de tirarlos o limpiarlos para ser reutilizados.
5. Mujeres embarazadas y madres amamantando no deben trabajar con sustancias peligrosas y/o material biológico infeccioso.
6. Almacenar sustancias y mezclas en recipientes adecuados marcando:
 - contenido (sustancia, mezcla, concentración)
 - fecha, propietario, símbolo de peligro
7. Está prohibido almacenar reactivos en envases de alimentos.
8. No se debe colocar tapas boca abajo sobre la mesa:
 - eso deja residuos químicos sobre la mesa y
 - trae contaminación al recipiente
9. No se debe devolver reactivos a su envase original para evitar contaminación al recipiente original.
10. Se usa una espátula para sacar reactivos de su envase.
11. No se debe dañar las etiquetas al trasvasar (p.ej. por goteo).
12. No se debe llenar recipientes más de 90 % de su máxima capacidad.
13. Cerrar bien los recipientes no usados.
14. Sustancias que producen polvos, gases, vapores o aerosoles tóxicos, nocivos, cancerígenos, corrosivos o inflamables se manejan en una campana de extracción.
15. Para el transporte hay que evitar derrames accidentales utilizando envases secundarios (estérilizables) o recipientes irrompibles.



Práctica 1

Bioseguridad

Tipo de práctica: grupal

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Adquirir el conocimiento para la mejor utilización de agentes biológicos en prácticas experimentales y con ello minimizar los riesgos que atenten contra la salud.

Introducción

La bioseguridad es el conjunto de medidas preventivas para reducir el riesgo de contraer enfermedades por diferentes agentes biológicos. En los laboratorios, donde se utilice cualquier material biológico, debe existir un manual de bioseguridad y una infraestructura adecuada para el manejo del agente biológico; sin embargo la actitud y el modo de proceder de aquellas personas que trabajan en estos laboratorios determinarán su propia seguridad.

Clasificación de los agentes biológicos por grupos de riesgos

La Organización Mundial de la Salud, la Ley General de Salud en México, el Real Decreto 664/1997 de España, la Directiva 2000/54/EC de la Unión Europea y el U.S. Department of Health and Human Services (HHS) coinciden en la clasificación, que se basa en cuatro aspectos generales:

1) Características biológicas del agente:

- Reproductividad (sexual, asexual, frecuencia)
- Capacidad de formar esporas, semillas etc.

2a) Virulencia para el ser humano

- Infeciosidad: dosis infectiva mínima, vías de penetración
- Patogenicidad: virulencia y toxicidad
- Modo de transmisión: por aerosoles, contacto, lesiones, vectores
- Datos epidemiológicos: presencia y grado de propagación así como inmunización de la población
- Tenacidad: capacidad de sobrevivencia (dentro y fuera del laboratorio)
- Tratamientos profilácticos y curativos

2b) Exposición en el trabajo

- Tipo de trabajo: organización y procedimiento
- Frecuencia de exposición
- Medidas preventivas y posibilidad de desinfección

3) Para el medio ambiente

- Relación con otros organismos (p.ej. predadores, insectos útiles como abejas)
- Relación a los ciclos de nutrientes (p.ej. fijación de nitrógeno)
- Cambios a la biodiversidad (extinguir formas silvestres)
- Medidas para un monitoreo

4) Organismos Genéticamente Modificados (GMO)

- Estabilidad genética del huésped y presencia de factores de virulencia (p.ej. *E. coli* K12)
- Estabilidad genética de la modificación en el huésped
- Movilización del vector/de la modificación genética (transferencia genética horizontal)
- Expresión de genes nuevos y la actividad del producto del gen (toxinas, factores de virulencia)

Basándose en esto los agentes biológicos se han clasificado en cuatro grupos de riesgo (RG):

Agente biológico del RG-1: Aquel que resulta poco probable que cause una enfermedad por infección en el ser humano. El RG-1 incluye organismos no conocidos como patógenos, microorganismos de RG > 1 con delección (es) en su (s) gen(es) de virulencia, psicrófilos (< 20 °C), termófilos (> 50 °C), acidófilos (pH < 4), alcalófilos (pH > 8,5), fotótrofo obligado así como cultivos celulares (de plantas, no-vertebrata y vertebrata sin primata). Cepas microbianas representativas pueden ser *Agrobacterium*, *Bacillus* (mayoría), *Desulfobacter*, *Escherichia coli* K12, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* (sin *acnes*), *Pseudomonas* (mayoría), *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*; *Aspergillus* (mayoría), *Candida* (varios), *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Ustilago*.

Agente biológico del RG-2: Aquel que puede causar una enfermedad en el ser humano y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la población y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. El RG-2 incluye la mayoría de organismos patógenos y parásitos, con virulencia baja para seres humanos sanos y baja probabilidad de causar una epidemia, como: patógenos para plantas (sin riesgo para animales), *Actinomyces*, *Bacillus cereus*, *Chlamydia*, *Clostridium* (algunos son RG-1), *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Mycobacterium* (varios son RG-3), *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*; *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, *Microsporium*, *Trichophyton*; *Trypanosomas* (varios son RG-3), *Toxoplasma gondii*; Adenovirus, Coronavirus, Epstein-Barr virus, Herpes simplex, Influenza virus, Papilloma virus, Polio virus así como material no caracterizado y posiblemente infeccioso (p.ej. heces, lodos activados, órganos de animales, fluidos corporales etc.).

Agente biológico del RG-3: Aquel que puede causar una enfermedad grave en el ser humano, presenta un serio peligro para los trabajadores y riesgo de que se propague a la población, pero existe generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz. El RG-3 incluye los organismos patógenos y parásitos, con virulencia moderada para seres humanos sanos y moderada probabilidad de causar una epidemia, como: *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Yersinia pestis*; *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*; *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*; Dengue virus, Hanta virus, Hepatitis virus, Rabia virus, Human immunodeficiency virus (HIV), Zinga virus; Creutzfeld-Jacob príon.

Agente biológico del RG-4: Aquel que puede causar una enfermedad grave en el ser humano, presenta un serio peligro para los trabajadores y alta probabilidad de que se propague a la población, sin que exista una profilaxis o tratamiento eficaz. Los virus son los únicos agentes biológicos presentes en este grupo, los más representativos son: Ebola virus, Flavivirus, Herpes B virus, Junin virus, Lassa fiebre virus, Machupo virus, Marburg virus, X-Arbovirus.



Fig. 1: Símbolo internacional de Riesgo Biológico

Medidas preventivas

En base a la clasificación en los 4 RG se puede implementar medidas preventivas para compensar el riesgo respectivo. Estas medidas preventivas pueden ser:

- a) Técnicas:
 - Construcción de edificios
 - Construcción de equipos
 - Material de protección individual
- b) Organizacionales:
 - Responsabilidades
 - Instrucciones de seguridad y señales
 - Anotación (experimentos, accidentes)
 - Cursos de seguridad
- c) Personales
 - Personal calificado
 - Técnicas (microbiológicas) apropiadas (GLP)
- d) Biológicas:
 - Células y vectores huéspedes seguros

La mayoría de las reglas a respecto de la bioseguridad se refiere a medidas técnicas de contención, es decir inhibir la liberación (accidental) de los agentes biológicos. Se diferencia entre 1) las técnicas de laboratorio, 2) equipo (barreras primarias) y 3) instalación/diseño del laboratorio (barreras secundarias).

1) Técnicas de laboratorio: El elemento más importante para contener los riesgos biológicos es el seguimiento estricto de las buenas prácticas y técnicas biológicas (GLP). Como parte de estas prácticas está el desarrollo o adopción por parte de cada laboratorio de un manual de operaciones (o manual de seguridad biológica) en que se identifiquen los riesgos que pueda sufrir el personal y que especifique los procedimientos que puedan minimizar los riesgos.

Las causas más comunes para infectarse son:

- Pipetear con la boca
- Lastimarse con agujas y jeringas
- Exposición a aerosoles liberados por agitación, centrifugación, desintegración, flamear asas, homogeneización, pipetear, ultrasónicas
- Falta de higiene: desinfectar área de trabajo, equipo y manos antes y después del trabajo así como inmediatamente cuando ocurre una contaminación o derrame; esterilizar material contaminado

2) Equipo de seguridad (barreras primarias): Se incluyen en este apartado tanto dispositivos o aparatos que garantizan la seguridad del personal (p.ej. campanas de seguridad biológica nivel 1, 2 ó 3 que eviten la liberación de aerosoles y filtran aires de escape (Fig. 2)), como las prendas de protección personal (guantes, mascarillas, batas, calzado, lentes etc.).

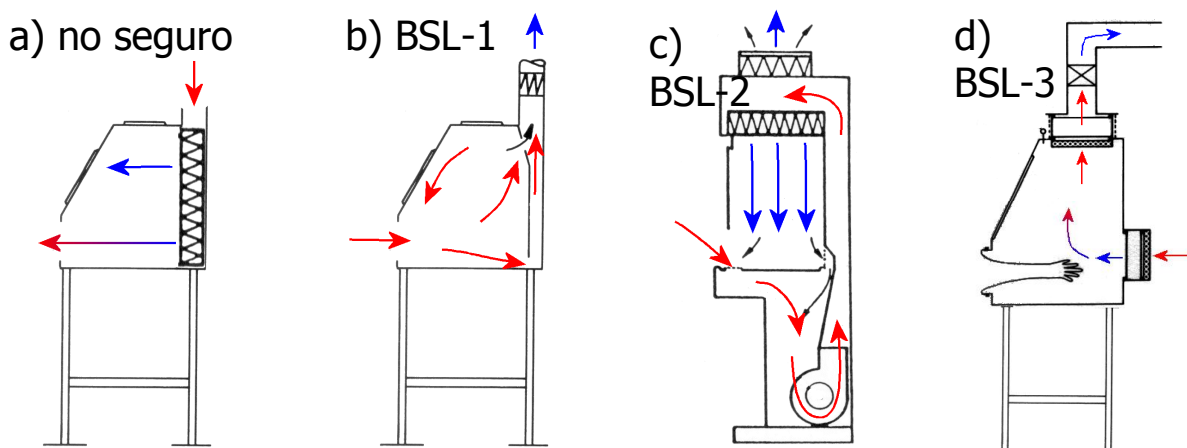


Fig. 2: Campanas, las flechas indican el flujo de aire: rojo = contaminado, azul = estéril. a) Banco de trabajo de aire limpio: estéril para el experimento e inseguro para el trabajador, que recibe aire contaminado. b) Campana de extracción, que protege el trabajador contra aerosoles, pero el experimento es expuesto a aire contaminado. c) Campana de flujo laminar: adecuado para trabajos de RG-2, protegiendo tanto al trabajador como al experimento. d) Cabina de alta bioseguridad, herméticamente sellada para evitar que cualquier agente biológico pueda salir; la manipulación ocurre a través de guantes: adecuado para trabajos de RG-3 y RG-4.

3) Diseño y construcción de la instalación (barreras secundarias): La magnitud de las barreras secundarias depende del tipo de agente infeccioso que se manipule en el laboratorio. Dentro de ellas se incluyen la separación de las zonas donde tiene acceso el público, la disponibilidad de sistemas de descontaminación (autoclaves, incineradores etc.), el filtrado de aire de salida, presión negativa, flujo de aire direccional etc. (Tab. 1).

Tab. 1: Medidas de contención (nivel de bioseguridad, BSL) que se aplican según la naturaleza de las actividades que está en concordancia con los grupos de riesgos (RG).

Medidas de contención	RG-2 BSL-2	RG-3 BSL-3	RG-4 BSL-4
1. Lugar de trabajo separado de toda actividad que se desarrolle en el mismo edificio	No	Aconsejable	Sí
2. El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtra por filtros de alta eficacia para partículas en el aire (HEPA) o de forma similar	No	Sí, para la salida de aire	Sí, para la entrada y salida de aire
3. Solamente se permitirá el acceso al personal designado	Aconsejable	Sí	Sí, con esclusa de aire
4. El lugar de trabajo debe ser precintado para permitir su desinfección (con gas)	No	Aconsejable	Sí
5. Procedimientos de desinfección específicos	Sí	Sí	Sí
6. El lugar de trabajo se mantendrá con una presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable	Sí
7. Control eficiente de vectores p.ej., roedores e insectos	Aconsejable	Sí	Sí
8. Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Sí, para mobiliario	como RG-2, además suelo	como RG-3, además techo y paredes
9. Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
10. Almacenamiento para agentes biológicos	Sí	Sí, seguro	Sí, de alta seguridad
11. Ventanilla de observación/un dispositivo alternativo en las zonas para que se pueda ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable	Sí
12. Laboratorio con equipo propio	Aconsejable	Sí	Sí
13. El material infectado, animales incluidos, se debe manejar en una cabina de seguridad biológica o en un aislador u otra contención apropiada	Cuando proceda	Sí, cuando la infección se propague por el aire	Sí
14. Incinerador para destrucción de animales muertos	Aconsejable	Sí, disponible	Sí, en el mismo lugar

Material a utilizar

Material didáctico y visita a los laboratorios donde se trabaja con material biológico.

Procedimiento

Esta práctica se iniciará en el salón de clases, donde el profesor explicará a los estudiantes las medidas de seguridad en los laboratorios donde se trabaja con material biológico (infeccioso). Después de ello el profesor trasladará a los estudiantes a cada uno de los laboratorios del Centro Universitario para enseñarles la infraestructura de cada laboratorio.

Resultados

Describir los resultados detalladamente en hojas blancas anexas y resumirlos en este cuadro.

Elementos de seguridad	Laboratorio de ...	Laboratorio de ...	Laboratorio de ...	Laboratorio de ...
Manual de Bioseguridad				
Clasificación de agentes biol. en grupos de riesgo				
Medidas de contención				

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

Definir los siguientes conceptos:

1. Agente biológico:

2. Microorganismo:

3. Cultivo celular:

4. Peligro:

5. Daño:

6. Riesgo:

7. Desinfección:

8. Contaminación:

9. Esterilización:

10. Incineración:

11. ¿Cuáles países cuentan con laboratorios de BSL-4?

Referencias bibliográficas

1. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial de la Federación del 3 de febrero de 1983. Disponible en:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
2. Manual de procedimientos de Bioseguridad. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México (2010). Disponible en:
http://www.biomedicas.unam.mx/_administracion/_unidades_apoyo_inst/manual_bioseguridad.pdf
3. Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo. B.O.E. No. 124 de 24 de Mayo.
4. Biosafety in Microbbiological and biomedical laboratories. U.S. Department of Health and Human Service, 5th ed. (2009). Disponible en:
<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf>
- 5a. Manual de Bioseguridad, OMS, 3^a ed. (2005)
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf
- 5b. Laboratory Biosafety manual, WHO, 3rd ed. (2004)
<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
6. Página Web del Laboratorio de Biología Celular en CUCIÉNEGA:
<http://radio.cuci.udg.mx/bch/ES/Sicherheit/index.html>

Práctica 2

Preparación de un banco de diluciones y uso del espectrofotómetro

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Enseñar al estudiante los conocimientos básicos para trabajar en un laboratorio de ciencias experimentales con buenas prácticas de laboratorio mediante la preparación de un banco de diluciones y el uso del espectrofotómetro.

Introducción

Banco de diluciones

Consiste en la disminución de la concentración de una muestra líquida concentrada (solución madre) donde el factor de dilución es constante y como resultado proporciona una progresión logarítmica para estudiar curvas de concentración.

Razón de dilución (dilution ratio) es la relación de diferentes solventes en una solución, p.ej. agua : metanol 30:70 significa 30 partes agua y 70 partes metanol (que suma 100 partes). Este sistema no necesariamente es binario, se puede mezclar más de 2 solventes, p.ej. agua : metanol : acetona 20:70:10, que significa 20 partes agua, 70 partes metanol y 10 partes acetona. Cuando se escribe la razón de dilución de un sistema binario, p.ej. agua : etanol 50:50, es 1:1 (que suma 2 partes).

El factor de dilución (dilution factor) describe la relación de la solución madre (stock solution) en el **volumen final**. La expresión "1:5", se dice "dilución 1 a 5" ("1 to 5 dilution"), significa 1 parte solución madre **en** 5 partes finales, es decir hay que añadir 4 partes diluyente (normalmente agua). El factor de dilución es $\frac{1}{5}$ (también se escribe 5). En este contexto la expresión 1:1 significa 1 parte solución madre en 1 parte final, es decir no diluido.

Diluciones también pueden ser seriales: Una dilución serial decimal de una solución madre, p.ej. de la concentración 1 M, podría ser 1 M; 0,1 M; 0,01 M; 0,001 M; esta dilución es llamada dilución logarítmica. El factor de dilución para cada dilución sería 0,1; para eso a 1 volumen de solución madre y se añadiría 9 volúmenes del diluyente y así sucesivamente. Los factores de dilución se puede multiplicar para saber el factor de dilución total: Para llegar de la solución 1 M a 0,001 M hay que hacer 3 diluciones 1:10, es decir el factor de dilución total es $0,1 \cdot 0,1 \cdot 0,1 = 0,001 = 10^{-3}$. Una dilución al doble del volumen se denomina a veces dilución semilogarítmica ($10^{0,5}$) (Aneja 2005; Madigan *et al.* 2004).

Fundamentos sobre el uso del espectrofotómetro

Absorción de luz: Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber radiación electromagnética a una frecuencia característica. En este proceso se transfiere energía a la molécula, que provoca una disminución en la intensidad de la radiación electromagnética incidente. Por consiguiente, la absorción de la radiación *atenúa* el rayo incidente de acuerdo con la ley de la absorción.

La ley de absorción, también conocida como ley de Lambert y Beer, o simplemente ley de Beer, proporciona información cuantitativa de cómo la atenuación de la radiación depende de la concentración (c) de las moléculas que la absorben y de la distancia (d) que recorre el rayo de luz en el medio ambiente (p.ej. una solución). Cuando la luz atraviesa una solución con el analito, la intensidad de la radiación disminuye (= atenuación) como consecuencia de la excitación del analito (= absorción) así como, en menor parte, la reflexión. Cuanto mayor sea la trayectoria (d) del rayo en la solución de analito de una concentración (c), habrá más analito que absorba la radiación, y la atenuación será mayor (Fig. 3). La absorbancia y transmitancia son fracciones respectivas en el espectro electromagnético de la luz. Debido a las interacciones que suceden entre los fotones y las partículas absorbentes (= analitos), la *intensidad* del rayo disminuye desde I_0 hasta I . La *transmitancia* T de la solución, es la fracción de radiación incidente que transmite la solución, tal como se muestra en la ecuación $T = I/I_0$. La transmitancia suele expresarse como porcentaje o porcentaje de transmitancia (Skoog *et al.*, 2003).

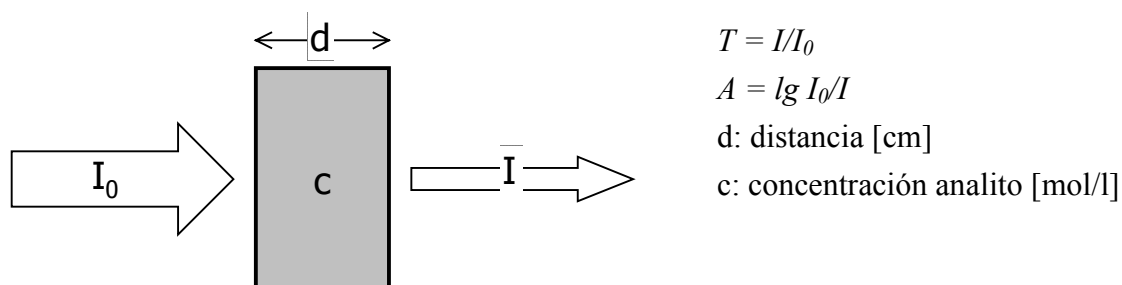


Fig. 3: Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente. La flecha más grande es el rayo incidente, significa que la energía radiante es mayor que la que trasmite la solución.

Espectrofotómetro

Este equipo es utilizado frecuentemente para análisis químicos en la industria farmacéutica y alimentaria. Sirve para medir la relación entre valores relativos de una misma magnitud fotométrica a dos haces de radiaciones, mide también la concentración o reacciones químicas o bioquímicas de una muestra; ambas mediciones se realizan en función de una longitud de onda (Skoog *et al.*, 2003). Estos instrumentos son utilizados principalmente para la cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos así como de microorganismos.

Material a utilizar

Microorganismos

Cualquier bacteria Gram negativa o positiva

Material

6 Tubos de ensayo de 16 × 150 mm

3 Tubos de ensayo de 13 × 100 mm

2 Matraces EM o

vasos de precipitados de 50 ml

6 Pipetas serológicas de 1 ml

2 Pipetas serológicas de 5 ó 10 ml

2 Celdas espectrofotométricas de 1 ml

1 Perilla de tres vías

1 Micropipeta de 10 a 100 µl

1 Micropipeta de 100 a 1000 µl

Puntas amarillas y azules

Tubos tipo Eppendorf

Consumibles

Solución madre de Safranina (100 g/l)

Etanol 70 %

Agua destilada (*A. dest.*)

Medios de cultivo

Tryptic Soy Broth (TSB) ó

Nutrient Broth (NB)

Equipo

1 Autoclave

1 Espectrofotómetro

1 Mechero Bunsen

Procedimiento

Esta práctica complementa el conocimiento y habilidad del estudiante en la preparación de diluciones seriadas, uso de soluciones, equipo o instrumentos utilizados en el área de farmacia y biotecnología. La preparación de una dispersión no sólo se debe asociar a la preparación de una solución química, también existen otro tipo de dispersiones, como en el caso de la biotecnología donde se utilizan soluciones isotónicas, medios de cultivos en forma líquida o de gel así como suspensiones de células. Por otra parte el uso del espectrofotómetro no sólo se utiliza para medir absorbancia o transmitancia en soluciones coloreadas sino también se puede utilizar para medir la absorbancia de una suspensión celular bacteriana, como se observará en esta práctica. Bancos de diluciones se usa frecuentemente para diluir soluciones químicas o suspensiones de células. En algunas disciplinas de la biotecnología o en ciertas circunstancias no es necesaria la exactitud de las mediciones de volúmenes o cantidades como frecuentemente se exige en el área de química.

Preparación del banco de diluciones (macrodilución)

1. Colocar los tubos de 16 ×150 mm en una gradilla y rotularlos de mayor a menor dilución 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} .
2. Añadir 9 ml de agua destilada a cada tubo de ensayo.
3. Adicionar 1 ml de la solución madre de safranina al tubo rotulado con la dilución 10^{-1} y mezclar.
4. Con una nueva pipeta transferir 1 ml del tubo 10^{-1} al tubo 10^{-2} y mezclar, así sucesivamente hasta el tubo 10^{-6} , no olvidar mezclar el tubo antes de realizar la transferencia.

Preparación e inoculación de un medio de cultivo líquido

1. Realizar los cálculos necesarios (seguir instrucciones del proveedor) para obtener la cantidad de medio de cultivo que se disolverán en 20 ml de *A. dest.*
2. Pesar el medio de cultivo en una balanza semianalítica y transferirlo a un matraz EM de 50 ml y adicionar 20 ml de *A. dest.* (en la preparación de medios de cultivo no es necesario aforar la solución).
3. Mezclar muy bien el medio de cultivo en el *A. dest.*; esta solución se le llama caldo de cultivo.
4. Transferir 3 ml de caldo de cultivo homogéneo, con una pipeta serológica de 5 ó 10 ml, a cada uno de los 6 tubos de ensayo.
5. Tapar estos tubos; dejarlos con la tapa floja para su esterilización (autoclave).
6. Inocular con 100 μ l de caldo con *Escherichia coli* 3 tubos con caldo de cultivo estéril e incubar 12 h a 37 °C.
7. Después de 12 h se obtendrá una suspensión celular de aprox. 10^9 células/ml.

Nota: Por fines prácticos, los puntos 5 y 6 pueden ser omitidos, si previo a la práctica los tubos con caldo de cultivo fueron esterilizados e inoculados.

Preparación del Banco de diluciones (microdilución)

1. Rotular los tubos tipo Eppendorf de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
2. Agregar 900 μ l de medio de cultivo estéril (el mismo de arriba) a cada tubo rotulado.
3. Transferir de la suspensión celular (muestra) con aprox. 10^9 cel/ml 100 μ l con una micropipeta, al primer tubo Eppendorf con 900 μ l de medio de cultivo y mezclar, ésta es una dilución 10^{-1} , a partir de aquí realizar diluciones hasta 10^{-3} . No olvidar mezclar.
4. De cada una de las diluciones transferir con una micropipeta 1 ml, de la suspensión celular más diluida (10^{-3}) hasta el tubo con 10^9 cel/ml, a una celda espectrofotométrica. Por otro lado transferir 1 ml de caldo de cultivo estéril a una segunda celda espectrofotométrica. La primera será la muestra y la segunda será la referencia.

Uso del espectrofotómetro

Calibrar el espectrofotómetro con la solución de referencia a $\lambda = 600 \text{ nm}$ (longitud de onda utilizada en suspensiones microbianas) y realizar la medición. Anotar las absorbancias (Abs).

Limpieza del lugar de trabajo

La desinfección de las mesetas se realiza con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. El cultivo en las celdas espectrofotométricas se regresa a los tubos con los cultivos utilizados en la práctica y a la celdas vacías se les agrega alcohol al 70 % después de 5 min se desecha el alcohol, se lavan las celdas con agua destilada y se dejan secar.

Eliminación de residuos biológicos

Los volúmenes restantes de caldos de cultivos con microorganismos o placas de Petri se esterilizan mediante un tratamiento térmico húmedo en un equipo llamado autoclave a 121 °C, 1 bar (15 psi) por 20 min. Después los caldos de cultivos se desechan al desagüe con abundante agua y el agar derretido se desecha a la basura general.

Resultados

Describir los resultados en hojas anexas

1. ¿Cuál es la concentración de la solución madre de safranina en mg/ml? Realice las operaciones.

2. ¿Cuál es la concentración en mg/ml por tubo en el banco de diluciones?

10⁻¹: _____

10⁻²: _____

10⁻³: _____

10⁻⁴: _____

10⁻⁵: _____

10⁻⁶: _____

3. Realizar los cálculos de la cantidad de medio de cultivo a pesar

4. Anotar el número de células en cada dilución y la absorbancia que le corresponde.

Muestras (cel/ml)	Abs (1)	Abs (2)	Abs (3)
Suspensión original = 10 ⁹			
Dilución 1/10 =			
Dilución 1/100 =			
Dilución 1/1000 =			

- 5. Graficar los resultados Abs vs concentración.
- 6. Con los resultados obtenidos responda a la siguiente pregunta: Si una suspensión bacteriana con 10^9 cel/ml tiene una absorbancia de _____ ¿cuántas células microbianas tendrán las diluciones?

Abs	Concentración celular (cel/ml)
Suspensión original =	10^9
Dilución 1/10 =	
Dilución 1/100 =	
Dilución 1/1000 =	

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿Cómo sería una dilución seriada semilogarítmica?

2. ¿Cuál es la diferencia entre una solución, suspensión, dispersión y emulsión? (no definir los conceptos de cada una).

3 ¿Cuándo se aplica la técnica de banco de diluciones en el área de farmacia?

4. ¿Para qué se utiliza una solución de referencia para medir al espectrofotómetro una muestra?

Referencias bibliográficas

1. Aneja K. R. (2005): Experiments in Microbiology. Plant Pathology and Biotechnology. 5^a ed., New Age Publisher, India. pp. 69
2. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004): Brock Biología de los Microorganismos. 10^a ed., Pearson Prentice Hall, España. pp. 146-147
4. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. (2003): Química Analítica. 7^a ed., Mc Graw Hill, México. pp. 575-576
5. Manual de Química General de la Universidad Pontificia Católica del Perú (UPCP). Disponible en: <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/contenido/62-tipos-de-soluciones-y-solubilidad>

Práctica 3

Partes del microscopio: observación de células y tejidos

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 2-4 h

Objetivo

Conocer los componentes del microscopio y adquirir la habilidad de usarlo mediante la observación de distintos tipos de células y tejidos.

Introducción

Microscopia

Es el uso de un rayo de luz o electrones para hacer visibles los objetos que no son visibles a simple vista. Sus principios generales son: radiación de longitud de onda, magnificación, resolución y contraste.

Radiación de longitud de onda

Cuando se habla de un haz de radiación se refiere tanto a rayos como ondas. La luz visible es una parte del espectro electromagnético que incluye rayos X, microondas y ondas de radio. Estas formas de radiación difieren en longitud de onda y la distancia entre dos puntos de la misma. El ojo humano es limitado a un rango de longitudes de onda (llamado "luz visible") y envía impulsos nerviosos al cerebro, el cual los interpreta como diferentes colores, p.ej. longitudes de onda de 400 nm como violeta y de 650 nm como rojo. La luz blanca está compuesta de muchos colores (longitudes de onda) y tiene un promedio de 550 nm (Fig. 4). Por otra parte los electrones son cargados negativamente y su movimiento actúa como ondas, donde sus longitudes dependen de su voltaje. Por ejemplo una longitud de onda de 10.000 V es 0,01 nm, mientras que una de 1.000.000 V es 0,001 nm. Esto significa que al usar radiaciones de longitudes de onda más pequeñas se incrementa la utilidad del microscopio.

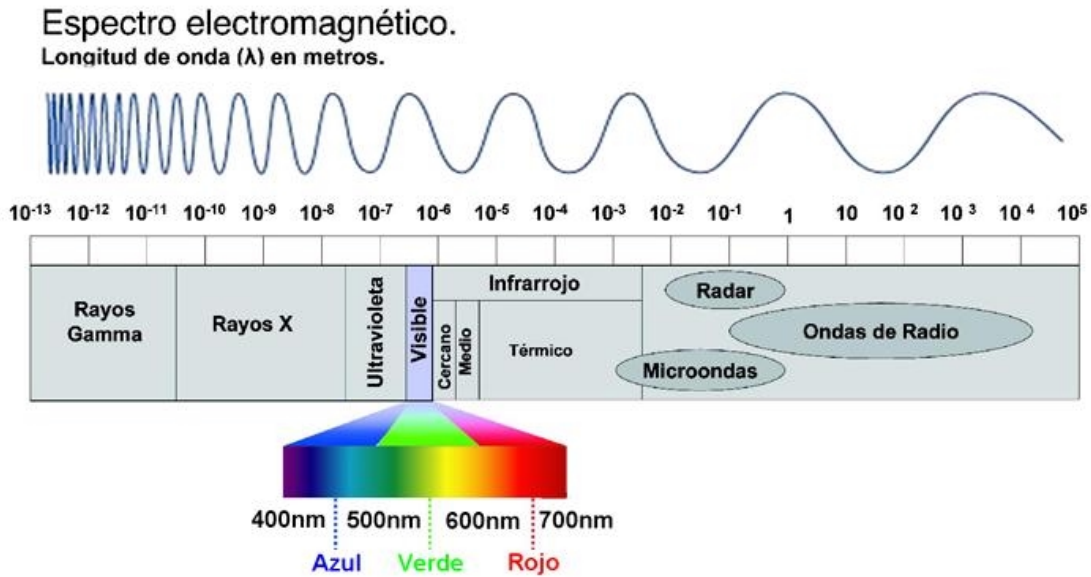


Fig. 4: Espectro electromagnético, imagen extraída de <http://1.bp.blogspot.com/>

Magnificación

Este concepto se refiere al aparente incremento del tamaño de un objeto, que es indicado por una "x" que significa "vez". La magnificación resulta cuando un haz de radiación refracta al cruzar una lente. Lentes con curvatura refractan la luz y campos magnéticos refractan el haz de electrones. Una lente con curvatura convexo refracta rayos de luz que pasan a través de su periferia en mayor proporción que cuando pasan en el centro; parecido como una serie de prismas: los rayos que atraviesan la lente se reencuentran en el *punto focal* (Fig. 5). En este punto focal los rayos se dispersan y favorecen al agrandamiento de la imagen (Fig. 6). El grado de la magnitud de la imagen depende del grosor de la lente, su curvatura y la velocidad de la luz al atravesar la muestra. Las propiedades que determinan la utilidad de la magnificación son *resolución* y *contraste*.

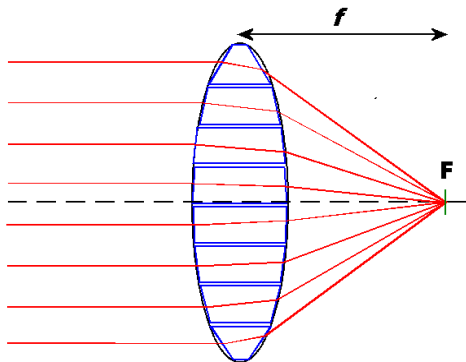


Fig. 5: Refracción de un haz de luz por una lente bi-convexo: distancia focal (f) y punto focal (F)

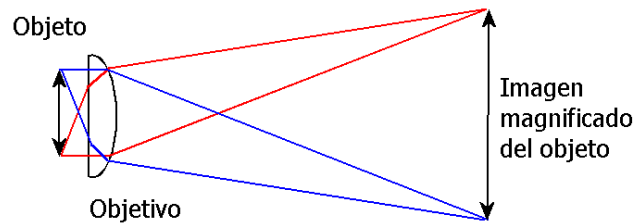


Fig. 6: Magnificación de un objeto por una lente plano-convexo

Resolución

Esta propiedad describe la habilidad de distinguir con claridad dos objetos muy cercanos. Cuando luz pasa por una apertura se difracta, que limita a la resolución (Fig. 7). Los microscopios modernos, que funcionan con luz visible y ultravioleta, pueden distinguir entre objetos de 200 nm de distancia, los electrónicos, que funcionan con haz de electrones, tienen un poder de resolución de 0,1 nm. La resolución depende de la longitud de onda de una radiación electromagnética, la apertura numérica de la lente y la capacidad de la lente para recuperar luz (Bauman, 2007).



Fig. 7: Poder de resolución: 2 puntos son resueltos, cuando sus patrones de difracción no se solapan (izquierdo), cuando se inician de solapar se alcanza el límite de resolución (centro) y cuando los puntos se solapan no son resueltos (derecho).

Contraste

Esta propiedad se refiere a las diferencias en intensidad del brillo entre dos objetos u objeto y el soporte (fondo). La mayoría de los microorganismos no son coloreados y presentan muy poco contraste. Una forma de aumentar el contraste es tiñéndolos. Otra forma es explotar las diferencias entre el índice de refracción de la célula y del medio; a este proceso se le llama *fase* (Nester *et al.*, 2004).

Parfocal

Normalmente los objetivos de microscopios ópticos son *parfocales*, es decir la distancia focal (f) no cambia con un cambio de objetivo y por lo tanto la magnificación. La distancia focal para un objetivo de menor magnificación es mayor; por eso, cuando hay que buscar el plano focal inicialmente moviendo la platina verticalmente, se debe usar un objetivo con baja magnificación para no romper la lente del objetivo con la muestra accidentalmente. Una vez encontrado el plano focal, se puede cambiar los objetivos sin mover la platina (verticalmente).

Para sacar la muestra es útil regresar al objetivo de baja magnificación para no dañar la lente de un objetivo por accidente.

Microscopios más utilizados

Tab. 2: Diferentes tipos de microscopía y su uso (Bauman, 2007)

Tipo de microscopio	Descripción de la imagen	Usos
a) Microscopio de luz:	Magnificación útil de 1x a 2.000x; resolución hasta 200 nm	Luz visible, la longitud de onda azul suministra mejor resolución
- Campo claro	Muestras coloreadas o no teñidas en contra de un fondo brillante	Observación y conteo de microorganismos muertos
- Campo oscuro	Muestras brillantes en contra de un fondo oscuro	Observación de microorganismos vivos y no teñidos
- Contraste de fases	Muestras con áreas claras y oscuras	Observación de estructuras internas de microorganismos vivos
- Nomarski	Parecen imágenes tridimensionales por contraste de interferencia diferencial	Observación de estructuras de microorganismos vivos
- Fluorescencia	Muestras con colores fluorescentes en contra de un fondo oscuro	Localización de estructuras o compuestos químicos específicos
- Confocal	Estructuras en un solo plano (corte óptico) normalmente en combinación con fluorescencia	Observación detallada de estructuras celulares en una población celular
b) Microscopio electrónico:	Magnificación típica 1.000x a 10.000x, resolución a 0,1 nm	Usa electrones con longitudes de onda corta; las muestras tienen que estar en vacío
- Transmisión	Monótono, doble dimensión, imagen altamente magnificada, puede tener un incremento de color	Observación de detalles ultra-estructurales extremas de células, virus y bacterias
- Scanning	Monótono, tridimensional, imagen altamente magnificada; puede tener un incremento de color	Observación de los detalles de la superficie de la estructura celular
Microscopios de proximidad	Magnificación mayor de 100.000.000x	Estos microscopios se mueven sobre la superficie de la muestra
- Scanning tunneling	Moléculas individuales y átomos visibles	Observación de la superficie del objeto, suministra finamente detalles
- Fuerza atómica	Moléculas individuales y átomos visibles	Observación de material biológico a nivel molecular y atómico

Material a utilizar

Material

- 3 Portaobjetos con muestras teñidas de células vegetales, bacterianas o levaduras
- 10 Portaobjetos con muestras montadas de tejidos animales
- 3 Cubreobjetos

Consumibles

- Etanol 70 %
- Agua destilada (*A. dest.*)

Equipo

- 1 Microscopio

Procedimiento

Observación al microscopio

1. Muestras fijadas y coloreadas sobre un portaobjetos les serán entregadas a cada uno de los equipos. Con las células vegetales y tejidos animales iniciar con el objetivo de 40x. Con las bacterianas y levaduras observar con el objetivo de 100x, se debe agregar una gota de aceite de inmersión.
2. Tomar el portaobjetos con la muestra y colocar el cubreobjetos sobre la muestra.
3. Colocar la preparación sobre la platina y asegurarla con las pinzas, ajustar el objetivo 10x con el revólver, enfocar primeramente con el tornillo macrométrico y después con el tornillo micrométrico. Con la muestra enfocada cambiar al objetivo 40x y reenfocar con el anillo micrométrico para lograr nitidez. Por último observar todo el campo con la perilla de movimiento. Antes de usar el objetivo de 100x colocar una gota pequeña de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos.

Limpieza del lugar de trabajo

La desinfección de las mesetas se realiza con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Si se utiliza aceite de inmersión limpiar el objetivo de 100x con un papel limpio y suave.

Eliminación de residuos biológicos

Al final de la práctica, si es necesario, los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o desecharlos directamente a donde se almacena el material de vidrio para reciclar. Los cubreobjetos se desechan al contenedor de basura punzocortante con la leyenda "Residuos Peligrosos, Sólidos Biológico-Infeciosos", que está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1). Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por lo tanto se debe diluirlas 1:10 para obtener una concentración final de 5 g/l.

Resultados

Describir los resultados en hojas anexas

1. Dibujar y señalar los componentes del microscopio.
2. Dibujar o fotografiar a las células observadas señalando los objetivos utilizados.
3. Dibujar o fotografiar a los tejidos, nombrarlos y señalar la forma celular dentro del tejido.

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. Usando un microscopio con el objetivo de 40x y una lente en el ocular de 10x ¿Cuántas veces magnificada se ve la muestra?

2. ¿Qué es aceite de inmersión?

3. ¿Por qué se debe utilizar aceite de inmersión con el objetivo de 100x y no con el objetivo de 10x?

4. ¿Describa los 4 partes más importante del microscopio? ¿A cuál sistema pertenece cada una?

Referencias bibliográficas

1. Bauman R. (2007): Microbiology with Diseases by Taxonomy. 2nd ed. Pearson, San Francisco, USA. pp. 93-122
2. Nester E.W., Anderson D.G., Roberts C.E., Pearsall N.N., Nester M.T. (2004): Microbiology: a Human Perspective. 4th ed. McGraw Hill, New York, USA. pp. 39-45

Práctica 4

Fijación y tinción de células eucariotas

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Adquirir habilidad en la fijación biológica y tinción de células eucariotas y observar con el microscopio sus formas, tamaños y distribución en un mismo plano.

Introducción

El árbol filogenético de la vida

En un árbol filogenético se representa a todos los organismos vivos que habitan este planeta y la relación evolutiva basada en sus características genéticas entre las especies u otras entidades que provienen de una ascendencia en común.

Origen de las células eucariotas

Aunque no hay un acuerdo cuando se originaron las eucariotas, se propone que fue hace unos 2.000 millones ($2 \cdot 10^9$) de años. Cada vez son mayores las evidencias que demuestran que las eucariotas son el producto de la fusión de una arquea y una bacteria. Se han propuesto tres posibles explicaciones principales y una adicional recientemente:

- 1) Las eucariotas son el producto de la fusión completa de dos o más células, el citoplasma procedente de una bacteria y el núcleo de una arquea (Martin, 2005).
- 2) Las eucariotas se desarrollaron de las arqueas y por una endosimbiosis adquirieron sus características eucariontas (bacteria modificada) a partir de una proto-mitocondria de origen eubacteriana (Lane, 2016).
- 3) Las eucariotas y arqueas se desarrollaron independientemente a partir de una eubacteria.
- 4) Una célula eucariota primitiva fue formada por la endosimbiosis de ambos arquea y bacteria por un tercer tipo de célula, llamado cronocito (Hartman y Fedorov, 2002).

Células eucariotas

Las células eucariotas son todos los miembros del reino animal y vegetal, incluyendo los hongos, cuales existen en dos formas multicelular (moho y seta) y unicelular (levadura) y los protozoarios (proto: primitivo; zoarios: animal); estos son exclusivamente unicelulares, las células animales y vegetales son multicelulares. Las células eucariotas tienen un tamaño alrededor de 10-100 μm y su morfología celular es muy variada. Estas células están definidas

por una membrana celular que la rodea, adicionalmente todos sus orgánulos están rodeados por membranas. La característica principal es la segregación del DNA celular en un núcleo definido, que es rodeado por una membrana doblada: la parte interna es orientada hacia el nucleoplasma y la parte externa continúa con el retículo endoplásmico rugoso, un lugar de ensamble de proteínas (transmembranales o extracelulares). Funcionalmente unido a este complejo es el aparato de Golgi, que modifica estas proteínas y las empaqueta en vesículas, p.ej. las vesículas secretoras, que transportan material celular a la superficie para liberarlo. Las mitocondrias, ubicadas en el citosol, son generadoras de ATP. Los lisosomas digieren el material extracelular para reciclarlo. Peroxisomas degradan moléculas no deseadas o poco comunes usando el oxígeno. La reproducción sexual en eucariotas generalmente se denomina meiosis, que es una forma especializada de división celular; sin embargo también existe además la reproducción asexual como en el caso de los mohos denominado mitosis (Lodish *et al.* 2005). Por último, la pared celular provee forma a la célula así como protección por alteraciones ambientales que puedan dañar su membrana celular. Las células animales y protozoarios no tienen pared celular, sin embargo las paredes celulares de levaduras, hongos y células vegetales tienen estructuras químicas únicas para cada uno de estos grupos.

Material a utilizar

Material biológico

Saccharomyces cerevisiae (levadura)

Cebolla (tejido vegetal)

Mucosa bucal (células humanas)

Material

3 Portaobjetos, 3 Cubreobjetos

1 Pinza de metal, 1 pinza de madera

1 Placa de 12 pocillos

1 Placa de Petri

1 Soporte de tinción (recipiente rectangular de plástico, 10 - 15 cm largo y 5 - 10 cm de ancho)

1 Escalpelo

1 Asa de Kolle

5 Palillos de madera

Consumibles

Etanol 70 %

Agua destilada (*A. dest.*)

Azul de metileno

Azul de toluidina

Soluciones isotónicas

KOH 0,1 M

Medios de Cultivo

Potato Dextrose Agar (PDA)

Equipo

1 Microscopio

1 Mechero Bunsen

Procedimiento

Las tinciones para las células eucariotas son muy variadas desde el uso de un solo colorante para observar uno de sus orgánulos hasta el uso de dos o más colorantes, adicionalmente soluciones químicas, para observar más de un orgánulo. La razón de esto es la complejidad de la estructura interna de las células eucariotas así como su gran variedad: animales, vegetales o hongos; sin embargo su tamaño (10-100 μm) facilita su observación. Además no todas las células eucariotas pueden ser fijadas de la misma forma, cada grupo tiene un procedimiento específico, que lo observaremos en esta práctica. A las eucariotas que tienen un tamaño menor 10 μm (p.ej. levaduras, hongos) se observa con la lente del objetivo 100x.

Tinción simple

Tinción simple a hongos y levaduras (p.ej. *Saccharomyces cerevisiae*)

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo, si es líquido, con el asa de Kolle o nicromo y colocarla en el centro del portaobjetos. Si es sólido tomar una gota de solución isotónica y colocarla en el portaobjetos. Después tomar una "asada" de la colonia y colocarla en medio de la gota.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida, si proviene de medio sólido, sólo 1 vez).

b) Colorear

1. Colocar unas gotas de azul de metileno sobre la muestra ya fijada y esperar 90 s.
2. Lavar con *A. dest.*, decantar y secar.
3. Colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar al microscopio: la levadura primeramente con el objetivo de 40x y después con el objetivo de 100x y aceite de inmersión.

Tinción especial para levaduras y hongos

El azul de toluidina es un colorante acidófilo y metacromático que pertenece al grupo de las tiácidas. Su característica principal es que tiñe selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos y fosfatos del DNA y RNA de las células; cuando se une a estas moléculas, altera su longitud de onda absorbida y de color azul se torna a color rojo. Esta técnica también es muy utilizada para tinciones nucleares *in vivo* en células humanas epiteliales de la mucosa bucal como diagnóstico precoz del cáncer bucal (López del Castillo *et al.*, 2010).

Levaduras y hongos (ejem. aislados de frutos en descomposición)

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo, si es líquido, con el asa de Kolle o nicromo y colocarla en el centro del portaobjetos. Si es sólido tomar una gota de solución isotónica y colocarla en el portaobjetos. Después tomar una "asada" de la colonia y colocarla en medio de la gota.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida, si proviene de medio sólido, solo 1 vez).

b) Colorear

1. Colocar unas gotas de etanol a 40% a la muestra fijada. Esperar 1 min.
2. Lavar con *A. dest.* y decantar.
3. Agregar unas gotas de KOH 0,1 M durante 10 min. Evitar deshidratación aplicando algunas gotas más.
4. Lavar con *A. dest.* y decantar.
5. Agregar unas gotas de azul de toluidina, esperar 2 min.
6. Lavar con *A. dest.*, decantar y secar.
7. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación y observar al microscopio, primeramente con el objetivo de 40x y después con el objetivo de 100x y aceite de inmersión. Las células a observar son rojas.

Tinción a células epidermales vegetal

Cutícula de la cebolla

a) Fijar

1. Partir una cebolla y separar sus capas, extraer con ayuda del escalpelo y una pinza la capa más delgada.
2. Depositar la capa en una placa Petri con solución isotónica. Introducir oblicuamente el portaobjetos en la placa y con ayuda de una pinza colocar la membrana en el portaobjetos, intentar que no queden arrugas.

b) Colorear

1. Cubrir con gotas de azul de metileno la capa de células y esperar 5 min.
2. Colocar el portaobjetos en la placa Petri vacía, un extremo en el borde y el otro en la base (inclinación aprox. 45°) lavar desde el extremo superior al inferior con un chorro débil de *A. dest.*, presionando con una pinza la capa de células para evitar que sea arrastrada.

3. Cuando el agua es clara o sin rastros del colorante, colocar el cubreobjetos sobre la muestra, presionar levemente para liberar la presencia de burbujas.
4. Observar al microscopio a 10x y 40x.

Tinción de células epiteliales animal con azul de metileno y azul de toluidina

Al usar azul de toluidina: fijar como es descrito en este apartado y colorear como esta descrito en la tinción para hongos y levaduras.

Células de la mucosa bucal

a) Fijar

1. Depositar una gota de solución isotónica a un portaobjetos limpio.
2. Raspar con un palillo la mucosa interna de la mejilla ejerciendo un poco de presión pero sin lastimar.
3. Extender y mezclar con el mismo palillo el material bucal sobre el portaobjetos que contiene la gota.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).

b) Colorear

1. Después de la fijación, colocar el portaobjetos sobre el soporte de tinción.
2. Agregar unas gotas de azul de metileno sobre la extensión y esperar 2 min.
3. Inclinar el portaobjetos y lavar con agua destilada con un chorro débil del extremo superior
4. Cuando ya no exista rastros del colorante, secar al aire o con papel absorbente (sin arrastrar).
5. Colocar un cubreobjetos sobre la muestra evitando burbujas de aire y observar primero con el objetivo de 40x y después con el objetivo de 100x y aceite de inmersión.

Limpieza del lugar de trabajo

La desinfección de las mesetas se realiza con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Con un paño limpio y suave limpiar la lente del objetivo 100x.

Eliminación de residuos biológicos

1. Los volúmenes restantes de caldos de cultivos con microorganismos o placas de Petri se esterilizan mediante un tratamiento térmico húmedo en un equipo llamado autoclave a 121 °C, 1 bar (15 psi) por 20 min. Después los caldos de cultivos se desecha, junto con abundante agua, al desagüe y el agar derretido se desecha al contenedor de basura general.
2. Al final de la práctica los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o desechos directamente a donde se almacena el material de vidrio para reciclar.

Los cubreobjetos se desechan al contenedor de basura punzocortante con la leyenda "Residuos Peligrosos, sólidos Biológico-Infeciosos", y está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1). Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por lo tanto se debe diluirlas 1:10 para obtener una concentración final de 5 g/l.

Resultados

Describir los resultados en las páginas en blanco anexas.

1. Dibujar o fotografiar cada tipo de célula observada y señalar en los dibujos los nombres de las estructuras observadas, de acuerdo a la siguiente lista:
 - a) Levaduras y hongos (señalar el tipo de tinción)
 - b) Células vegetales
 - c) Células animales

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿Qué tipo de morfología celular observó? ¿Qué tamaños en μm tienen las células que Ud observó?

2. ¿Por qué a las células eucariotas se les considera complejas?

3. ¿Cuáles otros tipos de tinciones existen para células eucariotas? Mencione por lo menos 4 que NO utilizó en la práctica

Referencias bibliográficas

1. Hartman H., Fedorov A. (2002): The origin of the eukaryotic cell: A genomic investigation. *PNAS*. 99:1420-1425.
2. Penney D.P., Powers J.M., Frank M., Willis C., Churukian C. (2002): Analysis and testing of biological stains – the Biological Stain Commission Procedures. *Biotech. & Histochem.*, 77: 237-275
3. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipkorsky S.L. & Darnel J. (2005): *Biología Celular y Molecular*. 5a ed. México, Médica Panamericana.
4. Martin W. (2005): Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8:637-637
5. Prescott M.L., Harley J.P., Klein D.A. (2005): *Microbiology*. 6th ed., McGraw Hill, Singapur. pp. 39-45
6. Bauman R. (2007): *Microbiology with Diseases by Taxonomy*. 2nd ed., Pearson, San Francisco, USA. pp. 93-122
7. Practicas de hematología y citología.
Disponible en <http://practicasdehematologiaycitologia.wordpress.com/2014/11/02/practica-no-3/>
8. López del Castillo C.A., Barrios-Sanchez O., Rojas-Casanova P., Bastian-Manso L. & Santana-Garay J.C. (2010). Eficacia del azul de toluidina y lugol en el diagnóstico precoz de cáncer bucal. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 14: 1-4
9. Lane, N. (2015): *The vital question: why is the life it is?* Profile Books. Pp. 157-191

Práctica 5

Fijación y tinción de células procariotas

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Adquirir habilidad en la fijación biológica y tinción de diferentes bacterias así como esporas bacterianas y observar con el microscopio sus formas, tamaños y distribución en un mismo plano.

Introducción

Procariotas

A diferencia de las eucariotas, los procariotas son más simples, debido a la ausencia de orgánulos, además todos son unicelulares. Los procariotas están formados por dos reinos: Eubacteria y Archaeobacteria. Éstas dos formas comparten una variedad de similitudes desde su tamaño, la simplicidad de sus estructuras y la reproducción asexual. Sin embargo la gran diferencia se basa en sus historias evolutivas. El término bacteria con "b" minúscula es frecuentemente sinónimo de procariota (y el termino más correcto sería "eubacteria") mientras el término Bacteria con "B" mayúscula se refiere al dominio filogenético. Las formas bacterianas no son tan variadas, frecuentemente son en forma esférica llamada cocos (el término "coco" se refiere a la forma redonda y el término en itálicas "*Coccus*" se refiere al género) o alargados llamados bacilos (el término "bacilo" se refiere a la forma alargada y el término en itálicas "*Bacillus*" se refiere al género) y son generalmente muy pequeños: un bacilo típico mide de 1 a 5 μm de largo por 1 μm de diámetro. La complejidad de las eucariotas está dada por el número de orgánulos y sus membranas que los rodean mientras las procariotas no tienen orgánulos y la única membrana es la que rodea al citoplasma llamada membrana citoplasmática. En el citoplasma se extiende una larga molécula de dos cadenas formando el único cromosoma bacteriano que se condensa para dar lugar a un complejo llamado nucleoide, que en general (es circular. Además muchos géneros de los procariotas contienen DNA extracromosómico de forma circular llamados plásmidos que suelen contener genes que confieren propiedades especiales a las células, pero no son genes que se requieren para la supervivencia. Por otro lado, en el citoplasma se encuentra los ribosomas donde se sintetiza las proteínas. Por último, la pared celular está rodeando a la membrana citoplasmática y proporciona rigidez estructural a las células (Madigan *et al.* 2005).

Fijación de células bacterianas

Las células teñidas y vistas bajo el microscopio deben ser semejantes a células vivas. La *fijación* es un proceso en cual las estructuras internas y externas de células o microorganismos son conservadas e inmovilizadas en una posición. Entonces, en la fijación se inactiva las enzimas, que pueden alterar la morfología celular, y se endurece las estructuras celulares, para que estas no se cambien durante la tinción y observación. Por lo tanto, la célula muere al momento de la fijación.

Hay dos tipos de fijación fundamentalmente diferentes:

1) Fijación al calor: las muestras biológicas se extiende (comúnmente bacterias) sobre el portaobjetos y con una flama azul se confiere calor seco prudentemente y se fija la película. Esto preserva la morfología pero no la estructura interna de las células.

2) Fijación química: se usa para proteger las estructuras finas internas de las células y la morfología subcelular. Los fijadores químicos penetran a las células y reaccionan con componentes celulares; usualmente proteínas y lípidos para inactivar, insolubilizar e inmovilizarlos. La mezcla común de fijadores contienen tales componentes como metanol, etanol, acetona, ácido acético, cloruro de mercurio, formaldehído o glutar(di)aldehído (Prescott *et al.*, 2005).

Tinciones comunes

Los diferentes *colorantes* usados para teñir cualquier tipo de célula tienen dos características en común:

- a) Tienen agentes cromóforos (el que proporciona color a la molécula) que absorben luz, al ser excitados emiten diferentes colores dependiendo de la longitud de onda.
- b) Pueden unirse a las células mediante uniones covalentes, iónicos o hidrofóbicos. P.ej., un colorante cargado positivamente puede unirse a las estructuras celulares cargadas negativamente.

Los colorantes ionizables pueden ser divididos en dos clases, de acuerdo con la naturaleza y carga de su grupo:

1) Colorantes básicos: Azul de metileno, fucsina básica, cristal-violeta, safranina o verde de malaquita tienen grupos con cargas positivas (algunas formas de nitrógeno tetravalente) y son generalmente comercializados como sales de cloruro. Los colorantes básicos se unen a las moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos y la mayoría de las proteínas. Dado que las superficies de la mayoría de las células son cargadas negativamente, los colorantes básicos son frecuentemente usados. Estos colorantes son utilizados para determinar el tamaño, forma y arreglo o distribución de las células.

2) Colorantes ácidos: Eosina, rosa de bengala o fucsina ácida poseen grupos cargados negativamente tales como carboxilos (-COOH) o hidroxilos (-OH). Los colorantes ácidos se unen a las estructuras celulares cargadas positivamente (Prescott *et al.*, 2005).

Las células pueden ser coloreadas *in-vitro* o *in-vivo* (p.ej. tejidos vivos). En las tinciones *in-vivo* las células o estructuras adquieren los colorantes de contraste y se puede estudiar sus arreglos, distribución, morfología mientras están desempeñando su función. Este tipo de tinción puede revelar donde o como se lleva a cabo una reacción química-enzimática dentro de las células o tejidos, donde se almacena algún producto químico determinado, donde está presente una proteína específica etc. Una tinción *in-vitro* es colorear células y estructuras que han sido extraídas de su sitio biológico y típicamente se observa formas, tamaños y estructuras con mejor detalle que *in-vivo* (Penney *et al.*, 2002). En esta práctica se realiza una tinción *in-vitro*

Las tinciones simples o diferenciales son las más utilizadas para material biológico en estudios preliminares.

Tinción simple: es el uso de un solo colorante, frecuentemente azul de metileno, que se aplica al material biológico mediante pasos sencillos. Esta tinción se utiliza principalmente para observar el tamaño, la morfología y la distribución de las células en el mismo plano (Bauman, 2007).

Tinción diferencial: es el uso de dos o más colorantes, donde uno es el que colorea y el (los) otro(s) es(son) utilizado(s) como mordiente(s) (proporciona mayor afinidad al colorante) o como colorante(s) de contraste. Esta tinción se utiliza para distinguir grupos de microorganismos en el mismo plano o contrastar estructuras externas o internas de la misma célula (Bauman, 2007).

Tinción específica: es el uso de uno o dos colorantes y otras soluciones químicas con el fin de fijar o dar contraste a la estructura de la célula bacteriana que se desee observar (Prescott *et al.* 2005).

Material a utilizar**Material biológico**

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*
Bacillus subtilis, *Streptococcus pyogenes*
Pseudomonas aureginosa

Material

6 Portaobjetos
 6 Cubreobjetos
 1 Placa de Petri
 1 Soporte de tinción (ver practica 4)
 1 Asa de Kolle

Consumibles

Etanol 40 y 70 %
 Agua destilada (*A. dest.*)
 Azul de metileno
 Cristal violeta

Safranina
 Lugol
 Etanol-Acetona
 Soluciones isotónicas
 Safranina 0,5%
 Verde de malaquita 5%
 Aceite de inmersión
 4 Trozos de papel filtro (2*3cm)

Medios de Cultivo

Lysogeny Broth (LB)
 Trypticase Soy Agar (TSA)

Equipo

1 Placa de calentamiento
 1 Microscopio
 1 Mechero Bunsen

Procedimiento

A diferencia de las células eucariotas, para observar a las células procariotas es muy frecuente utilizar una sola forma para fijarlas.

Tinción simple: La tinción simple se realiza a hongos, levaduras, bacterias y células vegetales.

Bacterias Gram negativas o positivas

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo, si es líquido, con el asa de Kolle o nicromo y colocarla en el centro del portaobjetos. Si es sólido tomar una gota de solución isotónica y colocarla en el portaobjetos. Después tomar una "asada" de la colonia y colocarla en medio de la gota.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida, si proviene de medio sólido, sólo 1 vez).

b) Colorear

1. Colocar unas gotas de azul de metileno sobre la muestra ya fijada y esperar 90 s.
2. Lavar con *A. dest.* y decantar.
3. Secar y observar al microscopio la levadura con el objetivo de 40x; la bacteria, primeramente con el objetivo de 40x y después con el de 100x y aceite de inmersión.

Tinción diferencial: Tinción de Gram (Fig. 10)Cultivo puro y mixto de bacterias Gram negativas y positivas

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo líquido, con el asa y colocar en el centro del portaobjetos.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida).

b) Colorear

1. Colocar unas gotas de cristal violeta sobre la muestra ya fijada. Esperar 90 s.
2. Inclinar el portaobjetos y lavar del extremo superior con *A. dest.*
3. Colocar unas gotas de Lugol para lograr una mayor afinidad al colorante. Esperar 30 s.
4. Lavar con etanol-acetona por 20 s y decantar.
5. Lavar con *A. dest.* y decantar.
6. Agregar safranina y esperar 90 s.
7. Lavar con *A. dest.* y decantar.
8. Secar y observar al microscopio, primeramente con el objetivo de 40x y después con objetivo 100x y aceite de inmersión.

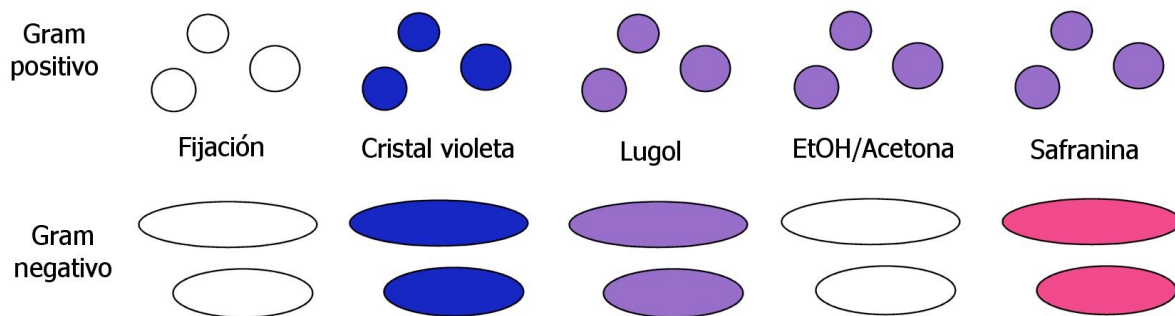


Fig. 10: Las fases de la tinción de Gram: Fijación, tinción con cristal violeta, aplicar mordiente con Lugol, decoloración con etanol/acetona y coloración de contraste con safranina.

Tinción de esporas

Cultivo puro de *Bacillus cereus* o *Bacillus subtilis*

I. Técnica de Azul de metileno

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo con bacterias del género *Bacillus* (p.ej. *Bacillus subtilis* o *Bacillus cereus*), si es líquido, con el asa de Kolle o nicromo y colocarla en el centro del portaobjetos. Si es sólido tomar una gota de solución isotónica y colocarla en el portaobjetos. Después tomar una "asada" de la colonia y colocarla en medio de la gota.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida, si proviene de medio sólido, sólo 1 vez).

b) Colorear

1. Colocar unas gotas de azul de metileno a la muestra fijada Esperar 5 min.
2. Lavar con *A. dest.* y decantar.
3. Lavar con *A. dest.*, decantar y secar.
4. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación y observar al microscopio, primeramente con el objetivo de 40x y después con el objetivo de 100x (antes de observar, agregar una gota de aceite inmersión sobre el cubreobjetos). El citoplasma se observará azul y las esporas serán puntos claros brillantes.

II. Técnica de Schaeffer-Fulton

a) Fijar

1. Desengrasar el portaobjetos con etanol.
2. Tomar una gota del cultivo con bacterias del género *Bacillus* (p.ej. *Bacillus subtilis* o *Bacillus cereus*), si es líquido, con el asa de Kolle o nicromo y colocarla en el centro del portaobjetos. Si es sólido tomar una gota de solución isotónica y colocarla en el portaobjetos. Después tomar una "asada" de la colonia y colocarla en medio de la gota.
3. Extender con el asa haciendo un óvalo.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).
5. Repetir a partir del paso 2 (3 ó 4 veces cuando es líquido o la muestra es muy diluida, si proviene de medio sólido, sólo 1 vez).

b) Colorear

1. Colocar un trozo de papel filtro sobre el portaobjetos, un poco más grande del tamaño de la muestra fijada.
2. Cubrir todo el papel filtro con verde de malaquita (solución acuosa al 5%).
3. Colocar la preparación sobre un vaso de precipitado de 250 ml; éste debe tener agua común hirviendo para evitar la deshidratación, agregar otras gotas del colorante (evitar vapores blancos): la hidratación con el colorante se debe hacer tres veces, mientras la preparación está calentándose aproximadamente 5 min.
4. Quitar el papel con unas pinzas y desecharlo en el contenedor de basura general.
5. Lavar la preparación con *A. dest.* y decantar.
6. Agregar unas gotas del colorante de contraste safranina al 0,5% (no usar la misma solución de safranina utilizada en la tinción de Gram), esperar 30 s.
7. Lavar con *A. dest.*, decantar y secar.
8. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación y observar al microscopio, primeramente con el objetivo de 40x y después con el objetivo de 100x (antes de observar, agregar una gota de aceite inmersión sobre el cubreobjeto). Las células se observarán rojas y las esporas verdes.

Limpieza del lugar de trabajo

La desinfección de las mesetas se realiza con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Limpiar con un paño limpio y suave la lente del objetivo 100x.

Eliminación de residuos biológicos

1. Los volúmenes restantes de caldos de cultivos con microorganismos o placas de Petri se esterilizan mediante un tratamiento térmico húmedo en un equipo llamado autoclave a 121 °C, 1 bar (15 psi) por 20 min. Después los caldos de cultivos se desecha, junto con abundante agua, al desagüe y el agar derretido se desecha al contenedor de basura general.
2. Al final de la práctica los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o desecharlos directamente a donde se almacena el material de vidrio para reciclar. Los cubreobjetos se desechan al contenedor de basura punzocortante con la leyenda "Residuos Peligrosos, sólidos Biológico-Infeciosos", y está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1). Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por lo tanto se debe diluirlas 1:10 para obtener una concentración final de 5 g/l.

Resultados

Describir los resultados en las páginas anexas.

Señalar en los dibujos los nombres de las estructuras observadas.

1. Dibujar o fotografiar cada bacteria observada.
2. Dibujar o fotografiar las esporas observadas.
3. Nombrar el género de cada bacteria o espora.

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿Por qué es necesario fijar la muestra?

2. ¿Qué diferencias observó al utilizar una tinción de Gram de una tinción simple?

3. ¿Por qué es necesario teñir la muestra?

4. ¿Cuáles géneros bacterianos son capaces de formar esporas?

Referencias bibliográficas

1. Penney D.P., Powers J.M., Frank M., Willis C., Churukian C. (2002): Analysis and testing of biological stains – the Biological Stain Commission Procedures. *Biotech. & Histochem.*, **77**: 237-275
2. Prescott M.L., Harley J.P., Klein D.A. (2005): Microbiology. 6th ed., McGraw Hill, Singapur. pp. 39-45
3. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004): Brock Biología de los Microorganismos. 10^a ed., Pearson Prentice Hall, España. pp. 146-147
4. Bauman R. (2007): Microbiology with Diseases by Taxonomy. 2nd ed., Pearson, San Francisco, USA. pp. 93-122
5. Winn W.C., Koneman E.W. (2013): Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6^a ed., Médica Panamericana.

Práctica 6

Observación de estructuras internas de células eucariotas

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Observar las estructuras internas de células animales como el núcleo y mitocondrias mediante la técnica de Frotis sanguíneo y el colorante Verde Janus respectivamente.

Introducción

Las células eucariotas son muy complejas con un citoplasma organizado con orgánulos limitados por membranas biológicas, que son similares en su composición a la membrana celular. El núcleo es el orgánulo más notable y característico tanto en células animales como en vegetales, hongos y protistas. Tomando en cuenta la naturaleza ácida o básica de las estructuras celulares y a la capacidad de oxidación de los colorantes azul de metileno (básico) y eosina (ácido), se logra distinguir coloraciones monocromáticas entre los gránulos y núcleo de los leucocitos al teñirlos con soluciones de Giemsa o Wright (Warhurst & Williams, 1996). Por esto mismo un ejemplo típico para observar una estructura interna de una célula animal es el núcleo. Por otra parte las mitocondrias son generadores de energía para la célula. Ellas aprovechan la energía de la oxidación de moléculas de los nutrientes para producir adenosina trifosfato (ATP); debido a esta condición el colorante Verde de Janus (Janus Green B), que se introduce al citoplasma, es en forma reducida incolora, pero cuando éste penetra al interior de las mitocondrias se oxida y vira a un color azul brillante (Kotsias, 2005).

Frotis sanguíneo: técnica fundamental para análisis clínicos

La técnica de frotis sanguíneo consiste en una extensión de sangre realizada sobre un portaobjetos con ayuda de otro portaobjetos (Fig. 8), que permite observar bajo el microscopio diferentes formas celulares sanguíneas (Fig. 9). Con débil aumento se explora la preparación para localizar la zona en la que el frotis es mejor.

En el campo del microscopio se ve con un dominio predominante los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes) teñidos de color rojo. No tienen núcleo y se observa un entorno más claro en medio que en los bordes. Los leucocitos (también llamados glóbulos blancos) se identifica fácilmente por la presencia del núcleo (Warhurst & Williams, 1996). Éstos se clasifican en:

Linfocitos: Un poco más grandes que los eritrocitos, con un núcleo muy voluminoso que ocupa casi toda la célula y aparece fuertemente teñido de un color violeta oscuro con Giemsa. Con Wright el núcleo es teñido de azul púrpura a azul oscuro profundo y el citoplasma de azul cielo.

Monocitos: Normalmente son los más grandes y son agranulocitos, pero son poco frecuentes y hay que desplazarse por la preparación para encontrar alguno. Tienen un núcleo muy grande y redondeado que aparece teñido en color violeta con Giemsa y Wright.

Polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos): Presentan el núcleo fragmentado, como lóbulos grandes.

Neutrófilos: Su núcleo es lobular y puede presentarse en forma de banda segmentado cubriendo la mitad de la célula. El núcleo se tiñe de color azul oscuro con Giemsa. Con Wright, el núcleo se tiñe de púrpura oscuro, el citoplasma rosa pálido y algunos gránulos pequeños de rojizo a lila.

Eosinófilos: Son granulocitos, poco abundantes de color rojizo y el núcleo teñido de color azul marino con Giemsa. Con Wright, el núcleo se tiñe de azul, el citoplasma rosa pálido, gránulos largos de rojo a rojo-naranja. Estas células aumentan su número en caso de parasitosis o alergia.

Basófilos: Presentan un núcleo teñido de rojo y gránulos en el citoplasma teñidos de color azul oscuro con Giemsa. Con Wright, el núcleo es teñido de púrpura a azul oscuro y los gránulos largos casi negros.

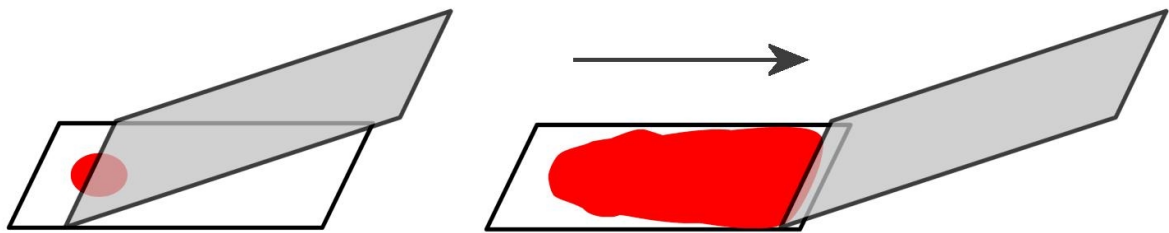


Fig. 8: Técnica del frotis sanguíneo extendiendo la gota de sangre de un extremo al otro de un portaobjetos.

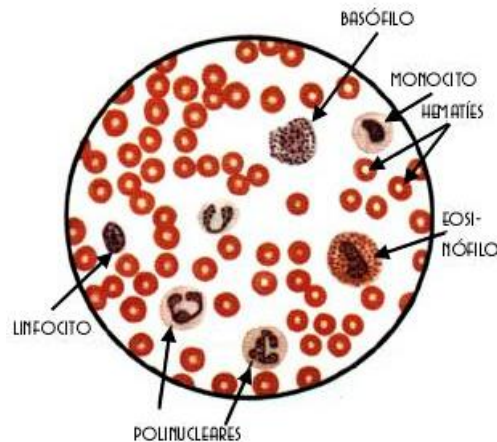


Fig. 9: Morfología celular y núcleo de las células sanguíneas (extraído de "Prácticas de citología").

Material a utilizar

Material biológico

Sangre humana

Mucosa bucal

Material

8 Portaobjetos

8 Cubreobjetos

2 Lancetas estériles

1 Soporte de tinción (recipiente rectangular de plástico, 10 - 15 cm largo y 5 - 10 cm de ancho)

1 Cinta adhesiva

2 Aplicadores de madera largos (del mismo ancho que el soporte de tinción)

2 Aplicadores de madera medianos (palillos largos)

Consumibles

Etanol 70 %

Agua destilada (*A. dest.*)

Metanol

Colorante de Giemsa o

Wright

Guantes de latex

Papel de cocina

Verde de Janus 0,05%

Solución isotónica

Equipo

1 Microscopio

1 Mechero Bunsen

Procedimiento

Tinción del núcleo por frotis sanguíneo

Una gota de sangre humana

Nota: En esta técnica se usa guantes.

a) Fijar

1. Colocar una servilleta de papel sobre la superficie donde se trabaja.
2. Colocar los 6 portaobjetos desengrasados sobre la servilleta.
3. Lavar y limpiar con un antiséptico el extremo libre del dedo índice.
4. Con la lanceta pinchar rápidamente el extremo del dedo.
5. Apretar la punta del dedo hasta lograr ver una gota de sangre.
6. Colocar una gota de sangre en el extremo de uno de los portaobjetos.
7. Seguidamente colocar un portaobjetos como lo indica Fig. 8 y deslizarlo de un extremo al otro. Hay que pasar sólo una vez de forma continua e ininterrumpida.
8. Repetir la operación con 2 portaobjetos más, con el fin de seleccionar la mejor tinción.
9. Secar al aire las extensiones lo más rápido posible. La desecación se facilita con un movimiento en forma de abanico, nunca soplando ni usando calor. La rápida desecación evita la deformación de las células sanguíneas.
10. Depositar el portaobjetos con la extensión de sangre encima del soporte de tinciones.
11. Depositar sobre la extensión unas gotas de metanol y esperar que se evapore.

b) Colorear

1. Una vez evaporado el metanol, depositar unas gotas de Giemsa o Wright (véase anexo) cubriendo toda la extensión, evitar desecación y esperar 5 min.
2. Lavar con *A. dest.* la preparación hasta que arrastre todo el colorante.
3. Secar al aire o bien al calor débil de la flama del mechero.
4. Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio iniciando con el objetivo de 40x y después con 100x y aceite de inmersión.
5. Identificar las células sanguíneas de acuerdo a la Fig. 9.

Nota: Esta técnica es muy útil en análisis clínicos para el conteo de células sanguíneas y comparar los resultados con valores estandarizados. En esta práctica no se tiene tal objetivo.

Tinción de las mitocondrias con Verde de Janus

Células de la mucosa bucal

a) Fijar

1. Depositar una gota de solución isotónica a un portaobjetos limpio.
2. Raspar con un palillo la mucosa interna de la mejilla ejerciendo un poco de presión pero sin lastimar.
3. Extender y mezclar con el mismo palillo el material bucal sobre el portaobjetos que contiene la gota.
4. Secar a los lados de la flama del mechero (sin quemar la muestra).

b) Colorear

1. Después de la fijación, colocar el portaobjetos sobre el soporte de tinción.
2. Agregar unas gotas de verde de Janus sobre la extensión y esperar 5 min.
3. Inclinar el portaobjetos y lavar con agua destilada con un chorro débil del extremo superior
4. Cuando ya no exista rastros del colorante, secar al aire o con papel absorbente (sin arrastrar).
5. Colocar un cubreobjetos sobre la muestra evitando burbujas de aire y observar con el objetivo de 100x (no olvidar usar aceite de inmersión). Las mitocondrias se observarán de color verde-azul brillante rodeando el núcleo.

Limpieza del lugar de trabajo

Las mesetas de trabajo se desinfectan con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Con un paño limpio y suave limpiar la lente del objetivo 100x.

Eliminación de residuos biológicos

1. Los guantes se deben colocar en el recipiente donde se almacena material biológico infeccioso. El color del recipiente es rojo con el símbolo de riesgo biológico (Fig. 1). Al final de la práctica los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o desecharlos directamente a donde se almacena el material de vidrio para reciclar. Los cubreobjetos se desechan al contenedor de basura punzocortante con la leyenda "Residuos Peligrosos, sólidos Biológico-Infecciosos", que está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1). Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por lo tanto se debe diluirlas 1:10 para obtener una concentración final de 5 g/l.
2. Objetos punzocortantes como tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, bisturí y estiletos de catéter deberán ser colocados en el recipiente hermético de color rojo etiquetado con la leyenda "Peligro, Residuos Peligroso; Punzocortantes Biológico-Infeccioso", que está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1).
3. En último caso, si no existe un depósito donde colocar todo el material, que estuvo en contacto con fluidos corporales (p.ej. sangre), este deberá ser esterilizado mediante un tratamiento térmico húmedo en un equipo llamado autoclave a 121 °C, 1 bar (15 psi) por 20 min. Después depositarlo en basura general.

Resultados

Describir los resultados en las hojas en blanco anexas.

1. Dibujar o fotografiar y nombrar los diferentes tipos de células sanguíneas con el núcleo correspondiente.
2. Dibujar o fotografiar las observaciones y señalar las estructuras mitocondriales.

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿Qué otras estructuras internas celulares eucariotas se podrían observar al microscopio de campo claro? ¿Por qué?

2. ¿Cuál estructura interna es la más notable dentro del compartimento de una célula vegetal?

3. Enliste las estructuras internas que constituyen a las células eucariotas y distinga cada una de ellas de acuerdo al tipo de célula animal, vegetal y hongos.

Referencias bibliográficas

1. Warhurst D.C., Williams J.E. (1996): Laboratory diagnosis of malaria. *J. Clin. Pathol.*, **49**: 533-538
2. Kotsias B. (2005). Las mitocondrias y el verde Jano. *Medicina.*, **65**:75-79
2. Prácticas de Citología (2007). Disponible en:
<http://www.juntadeandalucia.es/averroes/averroes/html/adjuntos/2007/12/13/0003/frotissangre.htm>

Práctica 7

Comportamiento de células eucariotas frente a soluciones con diferente osmolaridad y a diferentes temperaturas

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 4 h

Objetivo

Identificar el comportamiento de las células expuestas a soluciones isotónicas, hipotónicas e hipertónicas, así como la viabilidad celular cuando son expuestas a temperaturas diferentes a las de su hábitat.

Introducción

Las células eucariotas son vulnerables cuando son expuestas a parámetros físicos o químicos diferentes a las de su hábitat. Aunque la mayoría de ellas, en condiciones no muy severas, son capaces de mantener la viabilidad pero no la reproducción, es decir son capaces de sobrevivir. Sin embargo condiciones muy severas pueden dañarlas hasta provocar la muerte; algunos parámetros físicos son irradiación por luz UV dañando su DNA, temperaturas a partir de 40 °C provocando la desnaturalización de proteínas. Algunos parámetros químicos son pH bajos o altos desnaturalizando proteínas o soluciones hipertónicas o hipotónicas, que provocan un desequilibrio osmótico.

Tonicidad

La tonicidad es la osmolaridad de una solución comparada con la osmolaridad del citosol de célula. En otras palabras, es la relación entre la concentración de los iones (solutos) en una solución y los iones (solutos) dentro de las células. Las soluciones, que tienen la misma concentración (osmolaridad) de solutos que dentro de la célula, son llamadas soluciones isotónicas. Las soluciones con mayor osmolaridad que dentro de las células son llamadas hipertónicas, y las soluciones con menor osmolaridad que dentro de las células son hipotónicas (Speralakis, 2011).

Soluciones isotónicas: Cuando las células son sumergidos en una solución con la misma osmolaridad, la difusión del agua a través de la membrana celular es en ambas direcciones y el índice de difusión de agua es el mismo en ambos sitios. Entonces es una solución isotónica o isoosmótica. Ejemplo de una solución isotónica es una solución salina de NaCl al 0,9%.

Soluciones hipertónicas: En la biología una solución hipertónica (hiperosmótica) es una solución con mayor concentración de solutos que el citosol. Cuando se sumerge células dentro de una solución hipertónica, la tendencia del flujo de agua a través de la membrana celular es hacia fuera de las células con el fin de equilibrar las concentraciones de solutos. Ejemplos de soluciones hipertónicas son mermeladas, salmueras etc.

En el caso de células animales, las células pierden agua y se arrugan, se ven hundidas o se encogen, un proceso que se conoce como *crenación*.

En el caso de células vegetales o microbianas el agua también sale del citosol, el protoplasma se retrae, produciendo un espacio entre la membrana plasmática y la pared celular. A este fenómeno se le conoce como *plasmólisis*.

Soluciones hipotónicas: En la biología una solución hipotónica (hiposmótica) tiene menor concentración de solutos que el citosol o citoplasma. Cuando se sumerge células en soluciones hipotónicas el agua se difunde a través de la membrana celular del exterior hacia el interior de la célula con el fin de equilibrar las concentraciones de solutos para ambos sitios. Ejemplo típico de una solución hipotónica es el agua destilada (*A. dest.*).

Células animales sufren del fenómeno de *citólisis*, dado que el agua entra al citosol, la célula se hincha y se pueden romper las membranas. En el caso de eritrocitos, a este fenómeno se le denomina *hemólisis*.

En células vegetales ocurre una presión de turgencia: cuando el agua entra a la célula se hincha y se puede destruir la membrana (lisis) pero no la pared celular debido a su gran estabilidad; algo muy parecido pasa con los hongos y bacterias (Speralakis 2011, Donnersberger, 2002); aunque en el caso de bacterias la pared celular puede ser destruida.

Temperatura

La temperatura óptima es el índice de crecimiento máximo, que puede ser bastante diferente entre las especies. El índice de la mayoría de las reacciones bioquímicas incrementa cuando la temperatura también incrementa debido a la energía cinética de los reactantes. Sin embargo la conformación de las proteínas, tales como enzimas, es sensible a los cambios de temperatura (altas o bajas): estos cambios pueden dar lugar a la desnaturalización de las proteínas, es decir una alteración estructural a la forma tridimensional en que la proteína fue plegada causando modificaciones irreversibles en los sitios, donde los substratos y/o productos deberían unirse (sitios activos). Bajo esas condiciones el índice de reacciones catalizadas por enzimas decrece marcadamente. La temperatura óptima varía dependiendo del organismo, para poseer esta capacidad interviene la composición fosfolipídica de sus membrana celular y la composición de aminoácidos (polares o hidrófobos) de las enzimas (Bragada da Cruz, 2013). Sin embargo estas composiciones estructurales también ayudan a que los microorganismos soporten un rango amplio de temperaturas para reproducirse en el último de los casos sobrevivir. Para organismos

procariotas la temperatura de reproducción puede ser desde 5 °C hasta 113 °C (euritermales), organismos eucariotas tienen rangos menos amplios (estenotermales) como los protozoarios (20-56 °C), algas (16-60 °C), hongos y levaduras (25-62 °C), plantas vasculares (20-45 °C), musgos (30-50 °C), peces y otros vertebrados acuáticos (20-38 °C), insectos (15-50 °C) y crustáceos (20-50 °C). En el caso de los mamíferos mantienen fluctuaciones de temperatura corporal óptima entre 37-38 °C (Madigan *et al.*, 2004). Sin embargo el rango de temperatura a la que es capaz de reproducirse y/o sobrevivir es muy amplio y puede ser temperaturas desde bajo cero hasta temperaturas de 45°C.

Material a utilizar

Material biológico

Sangre humana

Levadura: *Saccharomyces cerevisiae*

Material

3 Portaobjetos

3 Cubreobjetos

2 Lancetas estériles

3 Vasos de ppdo. de 250 ml

Equipo

1 Microscopio

Consumibles

Etanol 70 %

Agua destilada (*A. dest.*)

Solución salina al 0,9 %

Solución salina al 1,5 %

Algodón

Aplicadores de madera

Papel para cocina

Medios de cultivo

PDB

Procedimiento

Células expuestas a diferente osmolaridad

Nota: utilizar guantes

3 gotas de sangre humana

Nota: Durante esta técnica es necesario usar guantes.

1. Colocar una servilleta de papel sobre la superficie donde se trabaja.
2. Colocar tres portaobjetos desengrasados sobre la servilleta, rotular en un extremo de un portaobjetos Iso (soln. isotónica), Hipo (soln. hipotónica), Hiper (soln. hipertónica).
3. Lavar y limpiar con un antiséptico el extremo libre del dedo índice.
4. Con la lanceta pinchar rápidamente el extremo del dedo.
5. Apretar la punta del dedo hasta ver una gota de sangre.
6. Colocar una gota de sangre sobre cada portaobjetos.

→

Nota: El siguiente proceso debe ser **rápido!** para evitar que la sangre se seque.

7. Al portaobjetos señalado con "Iso" colocar una gota de solución salina al 0,9%.
8. Con el aplicador mezclar suavemente las soluciones con la sangre de 3 a 5 s.
9. **Inmediatamente!** colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar al microscopio con el objetivo de 40x las células.
10. Al portaobjetos señalado con "Hipo" colocar una gota de *A. dest.*
11. Con el aplicador mezclar suavemente las soluciones con la sangre de 3 a 5 s.
12. **Inmediatamente!** colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar al microscopio con el objetivo de 40x las células.
13. Al portaobjetos señalado con "Hiper" colocar una gota de solución salina al 1,5%.
14. Con el aplicador mezclar suavemente las soluciones con la sangre de 3 a 5 s.
15. **Inmediatamente!** colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar al microscopio con el objetivo de 40x las células.

Células expuestas a diferentes temperaturas

Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

La temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* es 30 °C; en esta técnica la levadura será expuesta a tres diferentes temperaturas, todas fuera de su valor óptimo. Para corroborar la viabilidad de estas células, se agrega azul de tripano, un colorante que penetra sólo en membranas comprometidas o dañadas. Por lo tanto si las levaduras son viables no se teñirán de azul, por lo contrario estarán teñidas de azul. Por otro lado la tinción con azul de metileno es para observar si hubo algún cambio en su morfología.

1. Cuatro tubos con cultivos de levadura crecidas a 30 °C serán proporcionados a cada equipo.
2. Rotular un tubo con 30 °C
2. Rotular y cubrir con cinta adhesiva transparente los otros tres tubos, a las temperaturas a los que serán sometidos: 40 °C, 60 °C, 80 °C.
3. Colocar los tres tubos en cada vaso de precipitado con la temperatura correspondiente y esperar 10 min.
4. Después de 10 min, a los 4 tubos 30, 40, 60 y 80 °C realizar dos procedimientos A y B.

Procedimiento A

1. Realizar un frotis (ver práctica #4) para cada cultivo.
2. Colorear con azul de metileno (ver práctica #4) para cada cultivo.

Procedimiento B

1. Colocar una gota de cada cultivo en un portaobjetos.
2. Agregar una gota de azul de tripano, esperar 2-3 min.
3. Colocar el cubreobjetos, observar , primeramente al objetivo de 40x y pronto después al objetivo 100x (no olvidar aceite de inmersión) y si es posible contar el número de levaduras teñidas de azul.

Limpieza del lugar de trabajo

Las mesetas de trabajo se desinfectan con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Con un paño limpio y suave limpiar la lente del objetivo 100x.

Eliminación de residuos biológicos

1. Los volúmenes restantes de caldos de cultivos con microorganismos se esterilizan mediante un tratamiento térmico húmedo en un equipo llamado autoclave a 121 °C, 1 bar (15 psi) por 20 min. Después los caldos de cultivos y agar derretido se desechan al desagüe con abundante agua.
2. Los guantes se deben colocar en el recipiente donde se almacena material biológico infeccioso. El color del recipiente es rojo con el símbolo de riesgo biológico (Fig. 1). Al final de la práctica los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o desecharlos directamente a donde se almacena el material de vidrio para reciclar. Los cubreobjetos se desechan al contenedor de basura punzocortante con la leyenda "Residuos Peligrosos, sólidos Biológico-Infecciosos", que y está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1). Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/l de cloro libre y por lo tanto se debe diluirlas 1:10 para obtener una concentración final de 5 g/l.
3. Objetos punzocortantes como tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, bisturí y estiletos de catéter deberán ser colocados en el recipiente hermético de color rojo etiquetado con la leyenda "Residuos Peligrosos, sólidos Biológico-Infecciosos", que y está marcado con el símbolo internacional de riesgo biológico (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002: Fig. 1).
4. En último caso, si no existe un depósito donde colocar todo el material, que estuvo en contacto con fluidos corporales (p.ej. sangre), este deberá ser esterilizado (ver arriba #1, eliminación de residuos biológicos) y después depositarlo en basura general.

Resultados

Describir los resultados en las hojas anexas

1. Dibujar o fotografiar a las células normales, la crenación y la hemólisis.

Iso	Hipo	Hiper
-----	------	-------

2. Dibujar o fotografiar a las levaduras en las cuatro diferentes condiciones de temperatura con azul de metileno o con azul de tripano en el siguiente orden:

Temperatura [°C]	Azul de metileno	Azul de tripano	Número de levaduras	
			muertas	vivas
30				
40				
60				
80				

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿Qué ocurre en una célula vegetal si se sumerge en una solución salina al 5%?

2. ¿Por qué en las células vegetales no ocurre una lisis? ¿Qué tipo de componentes tiene su pared celular?

3. ¿Cuál es la diferencia entre osmolaridad y osmolalidad?

4. ¿Por las células animales tienen una temperatura óptima muy restringida comparada con otros organismos?

5. ¿Qué otras estructuras sufren desnaturalización además de las proteínas?

6. ¿Qué es la diferencia entre una solución isotónica y una solución fisiológica?

7. ¿Qué es la diferencia entre "iones" y "solutos"?

8. ¿Qué significa?

a) "iso-": _____

b) "hiper-" (hyper-): _____

a) "hipo-" (hypo-): _____

Referencias bibliográficas

1. Donnersberger A.B., Lesak A.E. (2002): Laboratorio de Anatomía y Fisiología. 1ª ed., Paidotribo, Barcelona, Spain. pp. 345-347
2. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004): Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed., Pearson Prentice Hall, España. pp. 146-147
3. Sperelakis N. (2011): Cell Physiology Source Book: Essential of Membrane Biophysics. 4th ed. Academic Press, Waltham, USA. pp. 288
4. Braga da Cruz A.L. (2013): Temperature impact on yeast metabolism: Insights from experimental and modeling approaches. Tesis doctoral de la Universidad Técnica de Delft, Holanda pp. 20-21

Práctica 8

Ciclo celular: mitosis en células vegetales

Tipo de práctica: Equipos

Duración de la práctica: 8 d

Objetivo

Observar, identificar y aprender las diferentes fases de la mitosis en células vegetales.

Introducción

Ciclo celular

El objetivo del ciclo celular es generar de una célula (madre) dos células hijas genéticamente idénticas: para eso se requiere duplicar en forma exacta el DNA cromosómico y distribuir las copias a las células hijas. Este proceso varía mucho en los distintos tipos de células. Por ejemplo, una levadura en condiciones ideales puede dividirse en aproximadamente 2 h, mientras que una célula hepática de mamífero en más o menos 24 h; aunque esto ocurre, en promedio, menos de una vez por año. El ciclo celular de eucariontes, examinado con el microscopio, muestra 4 fases, y los dos acontecimientos más notables son la división nuclear (mitosis) y la división de la célula en dos (citocinesis).

Mitosis

El mecanismo de la mitosis (del griego "mitos" = filamento, hilo) es semejante en todas las células eucariontes, aunque existen diferencias entre células animales y vegetales. Durante la interfase (G_1 , S y G_2) la célula se prepara a la división celular: formar biomasa, replicar el genoma, corroborar las condiciones adecuadas (p.ej. suficiente espacio). Durante toda la interfase el DNA está disperso y se observa como cordones finos. Al final de la fase G_2 la célula empieza la división celular (mitosis o fase M), que se puede diferenciar en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase; de éstas la de mayor duración suele tener la profase. Inicialmente el DNA se "condensa", es decir se compacta, y se forman los cromosomas, que ahora son teñibles; cada uno consiste en dos réplicas llamadas cromátidas unidas entre sí por el centrómero. Dentro de éste hay estructuras proteicas, los cinetócoros. Después los cromosomas se alinean, se separan los cromátidos a los dos polos de la célula, se re-estabiliza el núcleo y se inicia con la separación en dos células hijas (citocinesis). Al final la célula regresa a la fase G_0 , el estado fisiológico normal.

Material a utilizar

Material biológico

20 semillas de haba con 8 días de germinación

Material

Navajas de afeitar o escalpelo

Aguja de disección (recta)

Toallas de papel

Portaobjetos y cubreobjetos

Vidrios de reloj o placas Petri

Mechero Bunsen

Equipo

1 Microscopio

Consumibles

Acetocarmín

o Acetorceína

HCl (1 N)

Aceite de inmersión

Agua destilada (*A. dest.*)

Procedimiento

1. Escoger 20 semillas de habas y colocarlas sobre una servilleta de papel, estas a su vez colocarlas sobre una placa Petri y humedecer durante 8 días para lograr su germinación.
2. Realizar cortes transversales lo más delgado posible en los ápices radicales de las habas.
3. Colocar los cortes en placas Petri, vidrios de reloj o portaobjetos limpios y cubrirlos con unas gotas de HCl durante 15 min.
4. Después quitar el exceso del ácido con *A. dest.* y cubrirlos con unas gotas de acetocarmín (véase anexo I) y esperar 15 min.
5. Colocar un cubreobjeto sobre la muestra con acetocarmín, encima de esto una servilleta y presionar.
6. Proceder a observar las diferentes etapas de mitosis al microscopio con los objetivos de 40x y 100x.

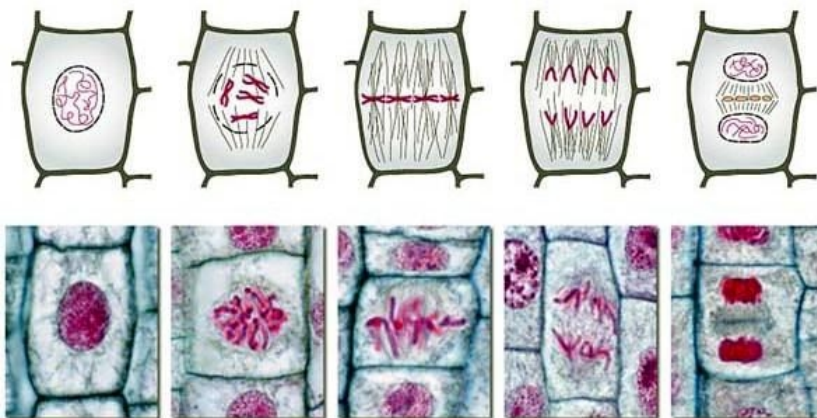


Fig. 10: Las diferentes fases de la mitosis de izquierda a derecha: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Extraída del Manual de Biología Celular y Molecular II

Limpieza del lugar de trabajo

Las mesetas de trabajo se desinfectan con etanol al 70 % antes y después de realizar la práctica. Con un paño limpio y suave limpiar la lente del objetivo 100x.

Eliminación de residuos biológicos

Al final de la práctica los portaobjetos con muestra pueden ser sumergidos en etanol al 70 % por 20 min o en solución de hipoclorito de sodio; después lavarlos con agua y jabón para ser reutilizados o depositados donde se almacena vidrio para reciclar.

Resultados

Describir los resultados en las hojas anexas.

1. Reconocer las fases celulares auxiliándose de la Fig. 10.
2. Dibujar y nombrar las fases celulares observadas en esta práctica.

Observaciones

Conclusiones

Cuestionario

1. ¿En cuánto tiempo aproximadamente ocurre una división celular en vegetales?

2. ¿Cuáles son las diferencias entre la mitosis de células animales y células vegetales?

3. ¿Qué es la diferencia entre células madres y células troncales?

4. Explique brevemente las fases de la mitosis:

Profase: _____

Metafase: _____

Anafase: _____

Telofase: _____

Citocinesis: _____

5. Mencione las principales diferencias entre mitosis y meiosis.

Referencias bibliográficas

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2011): Introducción a la Biología Celular. 3ª ed., Panamericana, México. pp. 609-614
2. Martínez-Trujillo M., Farias-Chagoya A., Ballesteros L. (2011): Manual de Prácticas de Biología Celular y Molecular II. Disponible en: <http://bios.biologia.umich.mx/>

