



BIOLOGÍA CELULAR

MANUAL DE LABORATORIO

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO
SANDRA JAQUELINE MENA HUERTAS
SANDRA LORENA ÁLVAREZ
MARIA ELENA SOLARTE CRUZ
GLADYS MILENA GUERRERO FLOREZ
JULIO SOUZA WEICH
LUZ ESTELA LAGOS MORA



UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

2017

Manual de laboratorio de biología celular / Edith Mariela Burbano Rosero... [et al.].- Pasto: Editorial Universitaria – Universidad de Nariño, 2017.

79 pág. : il.

Contenido: Introducción; Objetivos generales de la asignatura; Recomendaciones generales para el trabajo en laboratorio; Presentación de informe de laboratorio – bitácora; prácticas de laboratorio.

Incluye referencias bibliográficas, gráficas
ISBN: 978-958-8958-29-3

1. Estructura celular. 2. Moléculas constituyentes. 3. Laboratorios – normas
Bioseguridad I. Mena Huertas, Sandra Jaqueline II. Álvarez Sandra Lorena III. Solarte Cruz, María Elena IV. Guerrero Florez, Gladys Milena V. Souza Weich, Julio VI. Lagos Mora, Luz Estela

574.872 M292 – SCDD –Ed.20

Biblioteca Alberto Quijano Guerrero

BIOLOGÍA CELULAR MANUAL DE LABORATORIO

**Edith Mariela Burbano Rosero, Sandra Jaqueline Mena Huertas, Sandra Lorena Álvarez,
María Elena Solarte Cruz, Gladys Milena Guerrero Florez, Julio Souza Weich, Luz Estela Lagos Mora.**

Derechos reservados ©2017.

Prohibida la reproducción total o parcial de este material, sin autorización por escrito de la Universidad de Nariño.

ISBN: 978-958-8958-29-3



CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS GENERALES DE LA ASIGNATURA	5
3. RECOMENDACIONES GENERALES PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO	6
4. PRESENTACIÓN DE INFORME DE LABORATORIO-BITÁCORA	7
5. PRÁCTICAS DE LABORATORIO	8
5.1 BIOSEGURIDAD	8
5.2 UTILIZACIÓN DEL MICROSCOPIO DE LUZ	14
5.3 MEDICIONES MICROSCOPICAS	26
5.4 MACROMOLÉCULAS DE LEVADURA	32
5.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA	35
5.6 OBSERVACION Y RECONOCIMIENTO DE CELULAS PROCARIOTAS	39
5.7 DIFERENCIACION DE CELULAS VEGETALES	47
5.8 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS SANGUINEAS	51
5.9 ACTIVIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR	55
5.10 SEPARACIÓN Y ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE PIGMENTOS VEGETALES	62
5.11 ACTIVIDAD DE LOS LISOSOMAS	66
5.12 MITOSIS	69
5.13 MEIOSIS	75

1. INTRODUCCIÓN

Conociendo la organización y los procesos que se generan a nivel celular y sub-celular se puede comprender la fisiología de todas las organizaciones vivientes desde virus hasta animales; un examen superficial de las estructuras y funciones celulares típicas sugiere que de manera burda, las propiedades de todo organismo multicelular son el reflejo de las propiedades de sus componentes celulares microscópicos; de allí la importancia del curso de biología celular tanto para estudiantes de biología como para disciplinas afines a las ciencias biológicas, tal es el caso de las Ciencias agrícolas, Ciencias pecuarias, Ciencias naturales y Ciencias de la salud.

Por otra parte, la base histórica y moderna de la biología celular es la microscopía. Sin embargo, hoy en día los métodos microscópicos se han fusionado con los de la bioquímica, la genética y la biología molecular para producir una perspectiva más amplia en el estudio de las células como unidades vivas y eficientes.

La naturaleza dinámica de la célula es evidente por sus variadas respuestas a muchas clases de estímulos, su repertorio de mecanismos de regulación para enfrentarse a un ambiente interno y externo constantemente cambiante, su actitud para funcionar sola o en conjunto con otras células, en el tubo de ensayo o en el organismo, y por sus propiedades de renovación, crecimiento, reproducción y flexibilidad para la evolución.

El propósito de las prácticas planteadas en este manual es entender las estructuras celulares y sus moléculas constituyentes. Para tal efecto cada protocolo propuesto describe en detalle la metodología que se va a ejecutar, y mediante el reporte de la práctica realizada (bitácora) motiva al estudiante a fundamentar bibliográficamente las temáticas de cada una de ellas para poder comprender y analizar los fenómenos observados durante su desarrollo y así plasmar de forma coherente los resultados y conclusiones.

Para lograr un mejor aprovechamiento del manual se sugiere que los estudiantes lean las prácticas con anterioridad y hagan la revisión literaria correspondiente a cada temática, así se comprenderán mejor los resultados obtenidos durante su desarrollo y el estudiante tendrá suficientes herramientas para hacer una discusión adecuada en su bitácora.

Los experimentos que aquí se incluyen están diseñados para realizarse con el equipo de laboratorio con el que cuenta nuestra universidad, la metodología incluida está centrada en el desarrollo de habilidades de ejecución y de razonamiento que permitan al estudiante tener un buen desempeño en un laboratorio de biología celular; fomentando así, tanto el trabajo individual como colectivo.

Los autores

2. OBJETIVOS GENERALES DE LA ASIGNATURA

-  Describir la estructura, composición química y fisiología de las células como un fundamento para la comprensión de los organismos vivos.
-  Complementar y relacionar los conceptos presentados en la clase teórica con las observaciones prácticas.
-  Entrenar en la manipulación del microscopio de luz (instrumento básico para el estudio de la célula).
-  Fomentar en el estudiante el desarrollo de hábitos adecuados para el trabajo en laboratorio siguiendo las normas de bioseguridad.
-  Facilitar al estudiante el desarrollo de competencias científicas mediante el seguimiento del método científico en todas las prácticas programadas.

3. RECOMENDACIONES INICIALES PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO

-  **No es permitida la entrada de los estudiantes después** de iniciada la práctica de laboratorio. Los estudiantes deben estar en el laboratorio con varios minutos de anticipación para dar inicio a la práctica a la hora en programada.
-  La asistencia de los estudiantes es controlada por llamada a lista. Las sesiones de laboratorio no pueden ser recuperadas.
-  Las clases prácticas son basadas en el manual de laboratorio. Para un mejor aprovechamiento de las sesiones prácticas, el estudiante debe haber leído el protocolo correspondiente con bastante tiempo de antelación.
-  Una vez los estudiantes hayan recibido las instrucciones para la práctica de laboratorio, deben actuar por *iniciativa propia*.
-  Al final de cada práctica de laboratorio, el estudiante debe responder las preguntas, después de haberlas discutido con los colegas del grupo de trabajo o haciendo uso de relevantes y pertinentes referencias bibliográficas.
-  El grupo de estudiantes es responsable por el material (vidriería, pinzas, láminas, microscopio, etc.) que se le ha entregado al inicio de la práctica. Debe velar por el cuidado de los mismos, recordando que otros colegas utilizarán el mismo material para próximas prácticas.

4. PRESENTACIÓN DE INFORME DE LABORATORIO-BITÁCORA

-  Elabore los informes siguiendo las instrucciones dadas por el profesor que dirige la práctica.
-  El lenguaje debe ser claro, sucinto y objetivo.
-  Los diseños y gráficos deben ser realizados con líneas firmes y con lápiz.
-  Si usa colores para los dibujos, ellos deben ser fieles a lo observado en laboratorio (*no copiar los dibujos de atlas, de medios audiovisuales o de sus colegas*).
-  Para cada experiencia de laboratorio se debe realizar un informe en su bitácora considerando el siguiente orden de los ítems: Título, Introducción, Objetivos de la práctica, Metodología realizada (narración en pasado y en tercera persona), Resultados obtenidos (se incluyen dibujos biológicos, gráficas, tablas, esquemas y fotografías, etc.), Discusión de resultados (debidamente referenciada y contrastada con literatura pertinente), Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas.

5. PRÁCTICAS DE LABORATORIO

5.1. BIOSEGURIDAD

Bioseguridad es el conjunto de acciones que se encuentran orientadas a la prevención, disminución o eliminación de los riesgos inherentes a las actividades de investigación, producción, enseñanza, desarrollo tecnológico y prestación de servicios, las cuales pueden comprometer la salud del hombre, de los animales, del medio ambiente o de la calidad de los trabajos desarrollados.

Los agentes biológicos son considerados de acuerdo con la patogenicidad para el hombre, la virulencia, el modo de transmisión, la endemidad, la existencia o no de la profilaxis y de la terapéutica eficaz.

Existen 4 grupos distintos:

Grupo 1

- ⚠ Esta clase posee bajo riesgo individual y colectivo;
- ⚠ No constituyen riesgo para el medio ambiente;

Grupo 2

- ⚠ Esta clase posee riesgo individual moderado y riesgo colectivo limitado.
- ⚠ Microorganismos que pueden provocar enfermedades en el hombre, con poca probabilidad de alto riesgo para los profesionales de laboratorio. Ejemplos: *Schistosoma mansoni*, *Wuchereria bancrofti* y *Sporothrix schenckii*.

Grupo 3

- ⚠ Esta clase posee riesgo individual elevado y riesgo colectivo bajo, puede causar enfermedades graves a los profesionales de laboratorio. Ejemplos: *Mycobacterium tuberculosis*, HIV y *Trypanosoma cruzi*.

Grupo 4

- ⚠ Esta clase agrupa los agentes que causan enfermedades graves para el hombre y representan riesgo serio para los profesionales de laboratorio y para la colectividad.
- ⚠ Posee agentes patogénicos altamente infecciosos que se propagan fácilmente, pudiendo causar la muerte rápidamente. Ejemplos: Virus Ebola; Lassa; Machup; Marbug.

AEROSOLES – Son macropartículas sólidas o líquidas con dimensión aproximada de 0,1 μ y 50 μ , que puede permanecer en suspensión en condiciones viables por varias horas.

Vías aéreas de penetración

- ⚠ Pipetaje, centrifugación y abertura de la centrífuga en funcionamiento;
- ⚠ Maceración de tejidos, sonicación, agitación; flameo con asa de platina;
- ⚠ Abertura de ampollas liofilizadas;
- ⚠ Manipulación de fluidos orgánicos, abertura de frascos con cultivo de células.

Vía de penetración cutánea

- ⚠ Picada con agujas contaminadas;
- ⚠ vidriería quebrada o fragmentada;
- ⚠ Corte por instrumentos perforocortantes contaminados;

Contaminación vía ocular

- ⚠ Se presenta en recurrencia de ausencia de protección en los ojos por gólicas de material infectante.
- ⚠ Los oculares de microscopios e instrumentos ópticos contaminados pueden ser grandes fuentes de infección.

Contaminación vía oral

- ⚠ Pipetaje con la boca;
- ⚠ Hábito de fumar;
- ⚠ Comerse las uñas
- ⚠ Comer dentro del laboratorio.

Protección individual

- ⚠ Protector facial
- ⚠ Uso de bata de laboratorio de color blanco y botones
- ⚠ Gafas de seguridad
- ⚠ Guantes de cirugía (Preferiblemente de nitrilo y libres de talco)
- ⚠ Pipeteador o pera
- ⚠ Máscara

Protección colectiva

- ⚠ Cabinas extractoras o cabinas de flujo laminar, según procedimiento a realizar.
- ⚠ Duchas para lavado de emergencia.

Procedimiento de desinfección en caso de accidentes

1. Derramamiento simple de material líquido contaminado, con poca formación de aerosoles (grupo de riesgo 1 y 2)

- ⚠ Cubrir el área afectada con papel toalla
- ⚠ Colocar el desinfectante apropiado sobre el papel
- ⚠ Esperar por 30 minutos
- ⚠ Remover los papeles con pinza y colocarlos en una bolsa plástica usando guantes.
- ⚠ Aplicar nuevamente desinfectante.

2. Derramamiento de material líquido contaminado con formación de aerosoles. Ejemplo: gotas cayendo de la pipeta:

- ⚠ Sostener la respiración.
- ⚠ Abandonar el área por algunos minutos.
- ⚠ Proceder como en el caso de derramamiento simple.

3. Caída de medio de cultivo líquido o sólido con quiebra de recipiente:

- ⚠ Sostener la respiración
- ⚠ Abandonar el área
- ⚠ Atrancar la puerta colocando un aviso
- ⚠ Aguardar 30 minutos

- ⚠ Certificarse de la naturaleza del microorganismo involucrado para decidir sobre la protección necesaria y el desinfectante a ser utilizado.

Consideraciones finales

- ⚠ Accidentes son causados por actos inseguros o condiciones inseguras;
- ⚠ Nunca permanecer en un laboratorio sin un docente o técnico responsable.
- ⚠ Reactivos químicos o agentes patogénicos presentan mayores riesgos.
- ⚠ Siempre tener en lugar visible los teléfonos de emergencia.

¿Y..si yo no sé algo?????

...



Instrucciones de laboratorio, reconocimiento y manipulación del microscopio

Orden

1. Organizar el material necesario para la práctica, esto evita confusiones.
2. Use siempre el material de barrera necesario (bata de laboratorio, guantes, mascara, etc.)
3. Marque cuidadosamente todo el material;
4. Después de usar, lavar y limpiar, coloque todo el material en el lugar indicado.

Limpieza

1. Después de usar, lavar la vidriería y enjuagarla varias veces con agua limpia.
2. No descartar el material usado en el lavamanos
3. Deje el material y el lugar de trabajo tan limpio como gustaría encontrarlo.

Precauciones:

1. Siempre que ocurra un accidente en el trabajo, avise inmediatamente al profesor. Cuando caliente una sustancia en tubo de ensayo, no apunte la extremidad abierta para usted o para otras personas.
2. Nunca pruebe una solución.
3. Si cualquier sustancia cae en su piel, lavar varias veces con agua corriente.
4. Lea los rótulos de los frascos antes de usar las sustancias en ellos contenidas.
5. Cuando alguna sustancia cae en el piso o en la mesa de trabajo, limpie inmediatamente el lugar.
6. Cuando manipule el material de vidrio, proceda con cuidado para evitar quiebras y cortes peligrosos.
7. Sustancias inflamables deben ser calentadas en baño maría o en estufa eléctrica.

Aptitud:

- 1- Use el tiempo de laboratorio para realizar solamente el ejercicio indicado en la clase práctica.
- 2- Lea antes de la clase las instrucciones para el ejercicio del día.
- 3- Siga todas las instrucciones cuidadosamente.
- 4- Registre los resultados en su bitácora de laboratorio



ATENCIÓN: CUALQUIER ACTITUD DEL ESTUDIANTE QUE COLOQUE EN RIESGO DE ACCIDENTE AL LABORATORIO O A SUS COLEGAS, IMPLICARÁ SANCIONES DISCIPLINARIAS.

El personal de laboratorios de Biología trabaja por definición con organismos vivos, algunos de los cuales pueden ser patógenos, otros son completamente inocuos. Evitar la contaminación, la infección o la atracción de los organismos de trabajo es un elemento primordial de la competencia profesional del personal.

El laboratorio de biología de la Universidad de Nariño se clasifica como un laboratorio básico con nivel de bioseguridad mínimo que sirve para enseñanza básica y el trabajo se hace en la mesa de laboratorio al descubierto. Dentro de laboratorio se debe tener en cuenta un código de seguridad donde las reglas que se enuncia a continuación **DE FORMA REITERADA** deben cumplirse en pro de mantener la integridad física de los operarios (Estudiantes, docentes y auxiliares), el material biológico con que se trabaja, las instalaciones y asegurar así el éxito de las prácticas propuestas.

1. Debe leerse previamente la metodología o protocolo a desarrollarse y mantener una atención constante en el desarrollo de las prácticas.
2. No se deben hacer mezclas al azar de los reactivos.
3. No se permitirá pipetear con la boca, por tal razón cada grupo de laboratorio debe contar por lo menos con una pera para este efecto.
4. En la zona de trabajo del laboratorio no se permitirá al personal comer, beber, fumar, guardar alimentos ni aplicar cosméticos.
5. No se deberá pasar la lengua por las etiquetas; los materiales no se colocarán en la boca.
6. Habrá que mantener el laboratorio limpio y aseado, retirando el mismo cualquier material que no tenga relación con el trabajo.
7. Las superficies de trabajo se descontaminarán al terminar la jornada laboral y en caso de derramamiento de sustancias potencialmente peligrosas se informará inmediatamente al auxiliar correspondiente para que tome las medidas adecuadas.
8. Está terminantemente prohibido sentarse sobre los mesones de trabajo.
9. En el laboratorio se utilizarán batas, uniformes u otras prendas apropiadas. Esta ropa no se llevará fuera del laboratorio, en locales tales como oficinas, bibliotecas, salas de personal y cafeterías. Las prendas contaminadas se desinfectarán por procedimientos apropiados.
10. No se llevará calzado sin puntera (sandalias) y el cabello debe recogerse adecuadamente para evitar cualquier accidente.
11. Los elementos de protección de laboratorio no se guardarán en los mismos armarios que la ropa de calle.
12. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección.

13. Solo se autorizará el paso a la zona de trabajo de laboratorio a las personas que hayan sido informadas sobre los posibles riesgos y satisfagan cualquier requisito que se exija para entrar. Durante el trabajo se mantendrán cerradas las puertas de laboratorio.
14. No se permitirá la entrada en el laboratorio de animales que no tengan relación con los trabajos que se estén realizando.
15. El empleo de jeringas, agujas hipodérmicas y lancetas se realizará con sumo cuidado recibiendo la orientación previa y desechándolas adecuadamente, inmediatamente después de su uso.
16. Habrá que utilizar guantes en todos los trabajos en los cuales exista la posibilidad de tener contacto accidental directo con sangre, material infeccioso o animales infectados. Los guantes se deben quitar asépticamente y eliminar después de su uso y después deben lavarse las manos con agua y jabón adecuados.
17. Todos los derramamientos, accidentes y exposiciones reales o potenciales de material infeccioso se notificarán inmediatamente al director de laboratorio. Habrá que llevar un protocolo estricto de tales accidentes e incidentes.

Materiales

-  Bata de Laboratorio
-  Bitácora
-  Video-Beam (Conferencia a cargo del Jefe de Laboratorios o del profesor responsable de la asignatura).

Procedimiento

Las normas de Bioseguridad serán introducidas inicialmente a través de una conferencia de carácter obligatorio por el Jefe de Laboratorios o por la persona que él delegue y posteriormente las normas serán verificadas en el laboratorio asignado para las prácticas.



Cuestionario

1. Leer La Tercera Edición del Manual de Bioseguridad en laboratorio de la Organización Mundial de las Naciones Unidas, Ginebra 2005 (Este Manual será en entregado en pdf por el profesor).
2. Realizar un ensayo escrito que será socializado en la clase práctica. Cada grupo tendrá la asignación de un tema en particular:
 - ∞ Grupo 1: Evaluación del riesgo microbiológico
 - ∞ Grupo 2: Laboratorios básicos, niveles de bioseguridad 1 y 2
 - ∞ Grupo 3: Laboratorios de contención, nivel de bioseguridad 3
 - ∞ Grupo 4: Laboratorio de contención máxima, nivel de bioseguridad 4
 - ∞ Grupo 5: Bioprotección en el laboratorio
 - ∞ Grupo 6: Planes de contingencia y procedimientos de emergencia
 - ∞ Grupo 7: Desinfección y esterilización
 - ∞ Grupo 8: Bioseguridad y tecnología del DNA recombinante
 - ∞ Grupo 9: Sustancias químicas peligrosas

∞ Grupo 10: Otros peligros en el laboratorio

Bibliografía

1. *Safety in health-care laboratories*. Geneva, World Health Organization, 1997. http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_LAB_97.1.pdf.
2. Garner JS, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. *American Journal of Infection Control*, 1996, 24:24–52. (<http://www.cdc.gov/ncidod/hip/isolat/isolat.htm>).
3. Hunt GJ, Tabachnick WJ. Handling small arbovirus vectors safely during biosafety level 3 containment: *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) and exotic bluetongue viruses. *Journal of Medical Entomology*, 1996, 33:271–277.
4. National Research Council. *Occupational health and safety in the care and use of research animals*. Washington, DC, National Academy Press, 1997.
5. Richmond JY, Quimby F. Considerations for working safely with infectious disease agents in research animals. In: Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of animal models of infection*. London, Academic Press, 1999:69–74.
6. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*, 4th ed. Washington, DC, United States Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 1999.
7. *Class II (laminar flow) biohazard cabinetry*. Ann Arbor, MI, National Sanitation Foundation, 2002 (NSF/ANSI 49–2002).
8. Richmond JY, McKinney RW. *Primary containment for biohazards: selection, installation and use of biological safety cabinets*, 2nd ed. Washington, DC, United States Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 2000.

5.2. UTILIZACIÓN DEL MICROSCOPIO DE LUZ

Base teórica del microscopio óptico

Es un instrumento que se usa para preparaciones coloreadas, que son observadas por transiluminación. Consta de tres partes: un sistema mecánico, un sistema óptico y un sistema de iluminación (Figura 1).

a. Sistema mecánico: Está formado por una base, el brazo, el tubo del microscopio, la platina, los tornillos de enfoque y el revólver.

Base: También se conoce como pie, es una pieza que puede tener forma circular, rectangular o en forma de herradura en la que descansa todo el aparato, lo que le permite mantener la mayor estabilidad posible. En algunos microscopios la lámpara de iluminación y el espejo van empotrados en esta base.

Brazo: Está unido por una charnela o bisagra a la parte posterior de la base; en algunos puede inclinarse a voluntad el operador, aunque en la mayoría es fijo, disponiendo de la inclinación apropiada. El brazo es la parte del microscopio por la que se debe tomar el aparato para transportarlo.

Tubo de microscopio: Está colocado en el extremo del brazo que queda en sentido opuesto a la base. Este tubo en algunos se puede deslizar verticalmente gracias a una cremallera. En los microscopios modernos uniloculares o biloculares este realiza un giro de 360°. En el interior del tubo del microscopio se encuentran varias lentes que contribuyen con el sistema óptico para formar las imágenes. La longitud mecánica de este tubo se fija presentando pequeñísimas variantes en las diferentes marcas de microscopio. Por lo general esta longitud oscila entre 160 y 170 mm.

Revólver: Es una pieza giratoria colocada en el extremo inferior del tubo del microscopio; en él se atornillan los diferentes objetivos, los que se pueden cambiar con la simple rotación manual del revólver, buscando el tope que permita la fijación y posición exacta del objetivo para mayor precisión en el enfoque.

Platina: Es una superficie plana cuadrangular con un orificio central por el que pasa la luz procedente del sistema de iluminación. Está situado aproximadamente a la mitad de la longitud del brazo, arriba del condensador; se usa para colocar sobre ella las preparaciones que se van a observar, las cuales se sujetan con el par de pinzas removibles colocadas en la parte posterior de la platina. Sobre ésta se puede empotrar un carro mecánico montable, el que se desliza por tornillos colocados en la parte inferior izquierda de la platina, que permiten dos movimientos; un horizontal de derecha a izquierda y vertical de arriba a abajo o viceversa.

Tornillo para enfoque: Se localiza en la parte inferior o media del brazo; son de dos tipos:

1. Los de mayor tamaño llamados de cremallera o macrométricos que se usan para realizar un desplazamiento amplio y rápido
2. El de menor tamaño micrométrico o de enfoque fino.

b. Sistema óptico: El microscopio consta de tres sistemas de lentes: el condensador, los objetivos y el ocular

Objetivos: Van atornillados al revólver, generalmente en número de 4 o 5, encontramos algunos de menor aumento (3.2X, 6.5X, 8X, 10X, 12X); el de mayor aumento (40X ó 43X) y uno de inmersión (90X ó 100X). Estas lentes se identifican por el número grabado en ellas. La lente inferior es siempre plano-convexa, de foco muy corto y de diámetro tanto menor cuanto mayor sea el aumento. Detrás de esta lente hay otras que son las que corrigen las aberraciones cromáticas o esféricas. Seguido de los aumentos, se encuentra la apertura numérica (AN), que es la relación existente entre la distancia de trabajo y el seno del ángulo de refracción de la luz para cada uno de los objetivos.

Oculares: Están colocados en la parte superior del tubo del microscopio y por ello quedan más cerca del ojo del observador. La parte superior se llama lente ocular; la inferior lente de campo, que en conjunto dan un aumento parcial. Cada ocular tiene grabado un número seguido con una X que indica los diámetros de aumento que se pueden lograr. Existe también otro número que corresponde al índice del campo visual, dado en milímetros (mm). Estos oculares son intercambiables.

c. Sistema de iluminación

Se encuentra situado bajo la platina y tiene la función de iluminar los objetos por medio de luz transmitida, debido a que la mayoría de las observaciones se realizan por transparencia. Está representado por el espejo, condensador y diafragma.

Espejo: Presenta dos superficies, una plana y otra cóncava. Está empotrado en la base del microscopio de tal manera que pueda girar hacia cualquier lado. La cara plana del espejo se utiliza cuando se hacen observaciones en objetivos secos de menor aumento y la cóncava para grandes aumentos.

Condensador: Está constituido por un conjunto de lentes cuya función es concentrar la luz sobre el campo de la preparación por observar; se encuentra montado debajo de la platina. El montaje normalmente está dispuesto de tal modo que el condensador pueda subir o bajar accionando el tornillo colocado bajo la platina. Incluidos en el condensador pueden encontrarse los filtros y el diafragma. La fuente luminosa puede ser natural o artificial.

Diafragma: Se coloca empotrado y formando parte del condensador; consta de una serie de laminillas imbricadas unas sobre otras, las que actúan como las laminillas del diafragma de una cámara fotográfica, por lo que al operarse por medio de una palanca que sobresale del condensador se va abriendo o cerrando el círculo que permite o impide el paso de la luz hacia la lente superior del condensador, es decir que regula la cantidad de luz que recibe.

El condensador proyecta un cono de luz sobre el objeto y es tan importante como las otras lentes del microscopio. El objetivo proyecta una imagen aumentada del objeto en dirección del ocular, el cual amplía nuevamente la imagen y la proyecta sobre la retina, una pantalla o una placa fotográfica. La ampliación total es dada por una combinación de lentes que es igual al aumento del objetivo multiplicado por el aumento del ocular.

El condensador es en general subestimado por los que utilizan el microscopio, tal vez por no influir en el aumento de la imagen, pero influye en su nitidez y en la riqueza de sus detalles, puesto que actúa sobre el límite de resolución del sistema óptico del microscopio, aunque esta propiedad dependa principalmente del objetivo.

Microscopía: Iluminación de Köhler y diversidad celular

August Köhler (1866-1948), físico alemán, desarrolló un sistema que permite el alineamiento del sistema óptico con el sistema de iluminación sobre un mismo eje. Esto se realiza tomando como referencia el diafragma de campo, que es un dispositivo que se encuentra sobre a la fuente de luz, que regula la apertura para el paso de ésta. El diafragma de campo permite centrar el condensador móvil. La iluminación de Köhler crea un campo visual que ilumina uniformemente el espécimen. Esta técnica evita la aberración cromática, mejorando la resolución de las imágenes. Se pueden cambiar los objetivos (10X, 40X y 100X), sin tener que volver a alinear el sistema.

El tamaño de las células escapa **al poder de resolución** del ojo que se define como la distancia mínima entre dos puntos para que puedan verse como objetos separados. El descubrimiento de las células fue posible a partir de la invención del microscopio compuesto. El conocimiento de la célula y el papel que juega en la formación de los tejidos animales y vegetales ha avanzado de manera paralela al perfeccionamiento de las técnicas de microscopía. Una célula animal típica mide entre 10 y 30 μm de

diámetro, unas cinco veces menos que el diámetro de la partícula más pequeña observable por el ojo humano.

Se han desarrollado diferentes sistemas de iluminación para el microscopio, que permiten observar células o tejidos vivos, o fijados y teñidos.

El microscopio de campo claro es útil para la observación de material teñido, la tinción incrementa el contraste entre la muestra y el medio que lo rodea. La imagen formada resalta sobre un fondo blanco brillante. En este sistema, el trayecto que sigue la luz va desde la lámpara hasta el ojo del observador pasando por un sistema de lentes que la alinea y la concentra.

Para el uso correcto del microscopio es indispensable que al inicio de cualquier observación se realice la iluminación de Köhler alineando el condensador con respecto a la fuente de luz, su finalidad es obtener la iluminación óptima de la muestra.

Objetivos

-  Identificar y citar las funciones del microscopio de luz.
-  Relacionar la imagen formada y los aumentos obtenidos con el funcionamiento del sistema óptico.
-  Manipular correctamente el microscopio.

Materiales y reactivos

-  Microscopio de campo claro
-  Papel seda *
-  Aceite de inmersión
-  Pinzas de disección
-  Frasco con etanol
-  2 ml de azul de metileno al 0.2%
-  Bisturí *
-  Portaobjetos
-  Cubreobjetos
-  Palillos o hisopos*
-  Cebolla *
-  Papel toalla *
-  Compás*
-  Marcador de vidrio*
-  Jabón antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

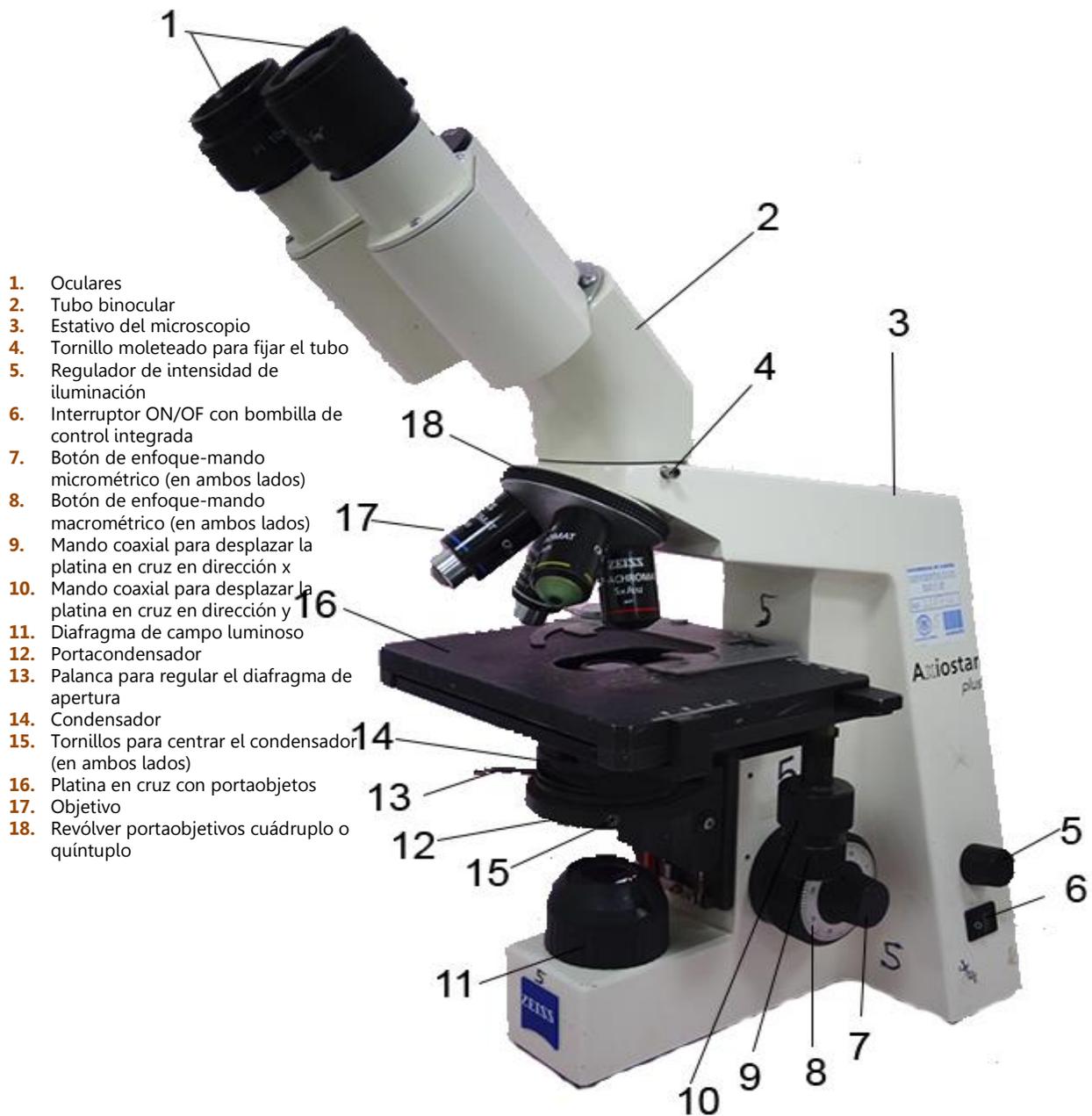


Figura 1. Partes del Microscopio óptico. Fuente: Modificada por los autores de Carl Zeiss. Light Microscopy. Instrucciones de manejo del microscopio Axiostar Plus. Microscopio de luz transmitida.

Procedimiento previo para verificación de las características del microscopio

Para que los microscopios proporcionen imágenes de buena calidad las lentes deben estar limpias, por lo que debe evitar tocarlas, ya que las huellas digitales alteran la calidad de la imagen observada. Solo si es imprescindible debe limpiar las lentes, para llevarlo a cabo utilice únicamente papel especial para la limpieza de las lentes (papel seda, tela ojo de pescado o tela especial para limpieza de gafas), no emplee pañuelos desechables ni hisopos. En el ambiente hay pequeñas partículas de polvo y si no se utiliza el material adecuado, las lentes se deterioran dañando la calidad de la imagen.

Use aceite de inmersión solo cuando va a utilizar el objetivo de 100X. Evite que los demás objetivos entren en contacto con el aceite.

Al finalizar la sesión de laboratorio siempre limpie el aceite de la lente.

I.- Iluminación de Köhler

1. Identifique con la ayuda de la Figura 1, las partes del microscopio y verifique su funcionamiento.
2. Abra el diafragma de iris y el diafragma de campo.
3. Suba el condensador hasta el tope, utilizando el tornillo del porta condensador (Figura 2).



Figura 2. Vista lateral del condensador. Fuente: Los autores.

4. Seleccione el objetivo de 10X.
5. Ajuste la distancia interpupilar. Enfoque una preparación con el tornillo macrométrico. Para realizar el enfoque fino use el tornillo micrométrico. Afine el enfoque para el ojo izquierdo con el *diópter*.
6. Cierre el diafragma de campo completamente, se debe ver una luz difusa como aparece en la Figura 3.



Figura 3. Vista del campo del microscopio con el diafragma de campo completamente cerrado. Fuente: Los autores.

7. Utilizando el tornillo del portacondensador, descienda el condensador hasta ver nítido el diafragma de campo que aparecerá como un polígono (Figura 4).

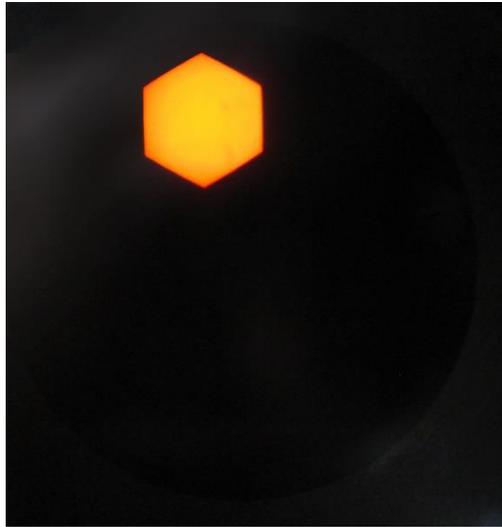


Figura 4. Enfoque del diafragma de campo mediante el tornillo del portacondensador.
Fuente: Los autores.

8. Centre este polígono con los tornillos posteriores (Figura 5).

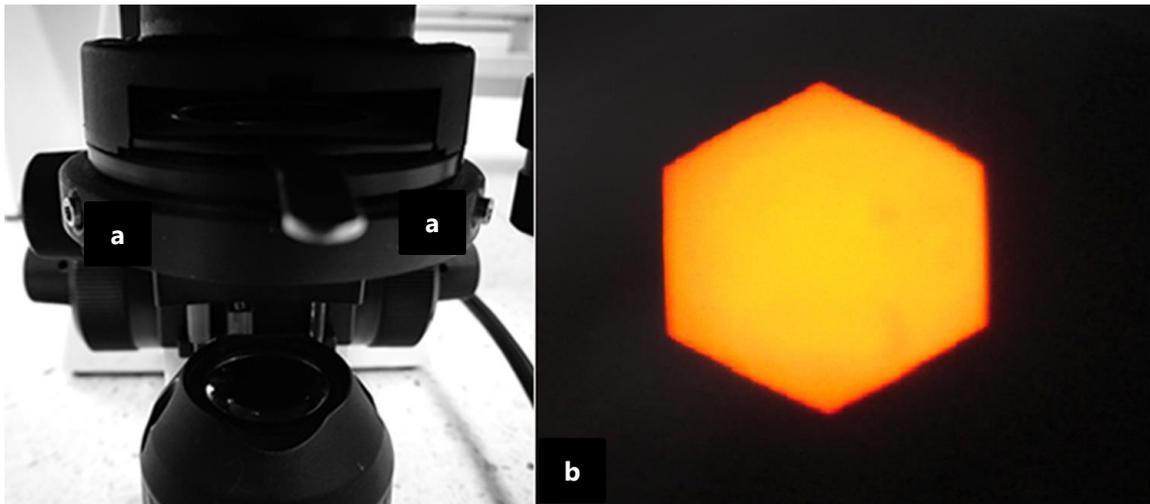


Figura 5. a) Vista posterior del microscopio en donde se muestran los tornillos de centrado del condensador, b) campo del microscopio en donde se observa el polígono centrado.
Fuente: Los autores.

9. Abra el diafragma de campo totalmente (Figura 6).

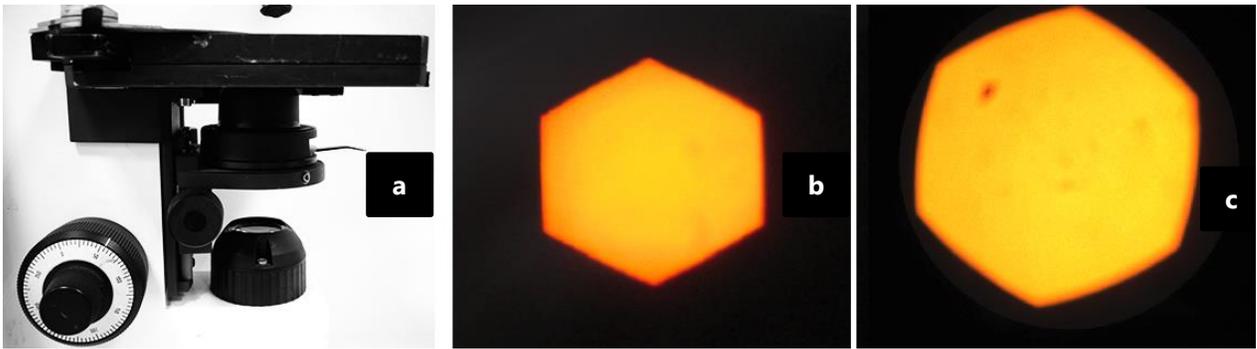


Figura 6. a) vista lateral del microscopio en donde se muestra la apertura del diafragma de campo, b y c) se abre el polígono hasta ocupar todo el campo. Fuente: Los autores.

10. Contraste la imagen con el diafragma de iris del condensador.
11. Para observar sus muestras con el objetivo de 40X y 100X solamente afine el enfoque con el tornillo micrométrico.



Figura 7. Vista lateral del microscopio en la que señala con una flecha la posición del diafragma del iris. Fuente: Los autores.

Bases ópticas de la microscopía – formación de la imagen

La luz que atraviesa las lentes condensadoras, es uniformemente distribuida sobre el portaobjetos y ultrapasa el objeto observado incidiendo en el objetivo. Estando el objeto colocado anteriormente al punto focal del lente objetivo se forma en el plano focal de la lente ocular, una imagen real (que puede ser proyectada en un antipar), mayor e invertida. La luz, al atravesar el ocular formará una imagen virtual mayor y derecha, con relación a la imagen formada por el objetivo. De este modo, la imagen final del objeto, proporcionada por el microscopio, será virtual, mayor e invertida.

El observador al examinar el material verá una imagen real e invertida con relación a la imagen formada por el ocular. El cerebro invierte esta imagen. El aumento final de la imagen es resultado del producto del aumento proporcionado por las lentes oculares y objetivos (Figura 9).

Poder de resolución: Se refiere a la capacidad de un sistema óptico para discriminar la imagen de un objeto que se encuentra en su campo de visión. Por ejemplo; abajo de un cierto límite mínimo (0,1mm), el ojo humano no identifica la ocurrencia de dos objetos distintos, eventualmente visualizándolos como un único objeto. Para poder calcular a que distancia real deben estar las dos estructuras o puntos para que se vean por separado se aplica la fórmula que relaciona la longitud de onda de la luz (550 nm) con el doble de la apertura numérica, el resultado es la distancia real en nm a la que se encuentran los dos puntos. Con el microscopio óptico, el poder separador máximo es de 0,2 décimas de micra. Mejora la visión unas 500 veces con relación a la del ojo humano (Figura 9).

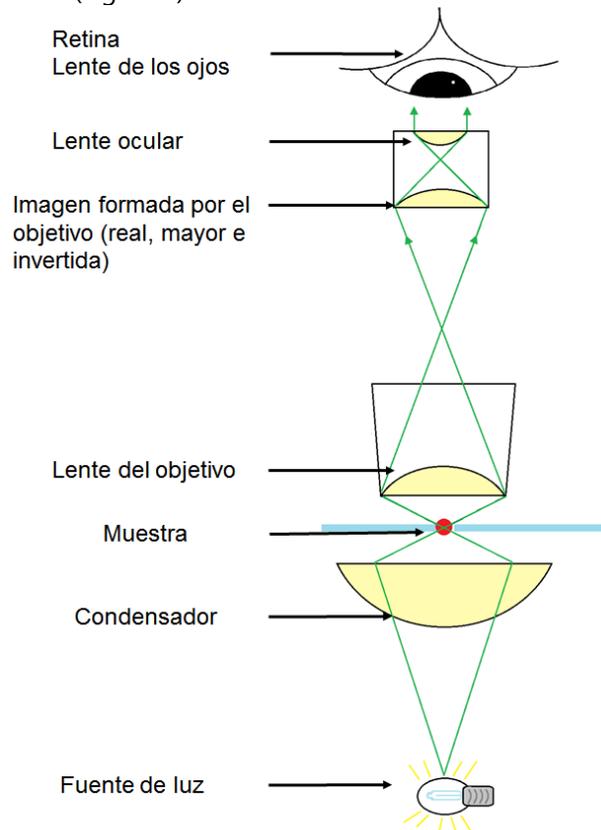


Figura 8. Principio de funcionamiento del microscopio de luz. Fuente: Los autores.

Poder de aumento: Permite magnificar la imagen. Corresponde al aumento (A) dado por la relación: Tamaño de la imagen / tamaño del objeto. La ampliación es igual al producto del aumento del lente ocular por el del objetivo. Cada objetivo y cada ocular tienen grabado el número de veces que aumentan la imagen. Si la imagen del objeto se hace aumentar 40 veces mediante el objetivo y enseguida 10 mediante el ocular, su aumento total será $10 \times 40 = 400$. ¿Cómo se calcula el aumento de una muestra?

Se multiplica el aumento que señala el ocular por el aumento del objetivo dando como resultado el aumento total de la muestra o número de veces en que el objeto se encuentra ampliado con respecto a su tamaño original.

Aumento total = aumento del ocular X aumento del objetivo X Factor de tubo (q)

Se calcula multiplicando el aumento del ocular por el aumento del objetivo respectivo, por factor de tubo, si es que el microscopio lo posee, de lo contrario q es igual a 1.

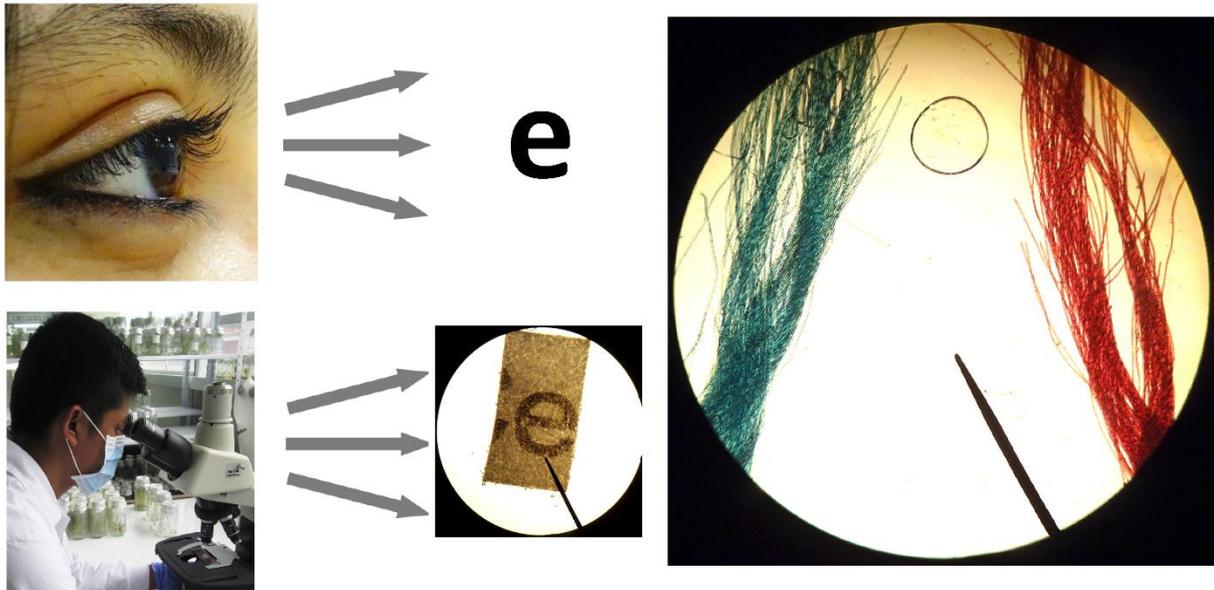


Figura 9. En la imagen de la izquierda se observan espacios blancos entre la tinta negra que a simple vista no serían observados. En la imagen de la derecha se observan varias fibras que conforman el hilo de costura. Fuente: Los autores.

El poder de resolución depende de la longitud de onda (λ) y de la apertura numérica del objetivo (A.N.) El Poder de resolución está dado por la fórmula:

Poder de resolución = $\frac{\lambda}{2 \times \text{A.N.}}$

λ

A.N: relaciona el ángulo de apertura de los rayos de luz, que provienen de la muestra, con el índice de refracción.

Límite de resolución – menor distancia que debe existir entre dos puntos para que ellos aparezcan individualizados (Figura 10).

Poder de definición: Se refiere a que el microscopio nos permite observar las formas puras de los objetos en estudio, es decir es la capacidad del objetivo de formar imágenes de contornos nítidos (Figura 10).

Poder de profundidad: Permite visualizar los diferentes planos de una preparación y está dado por el ajuste de precisión que se logra con el tornillo micrométrico. Se refiere a observar los objetos tridimensionalmente (3D). Al mover el tornillo micrométrico se puede observar estructuras que se encuentran en diferentes planos.

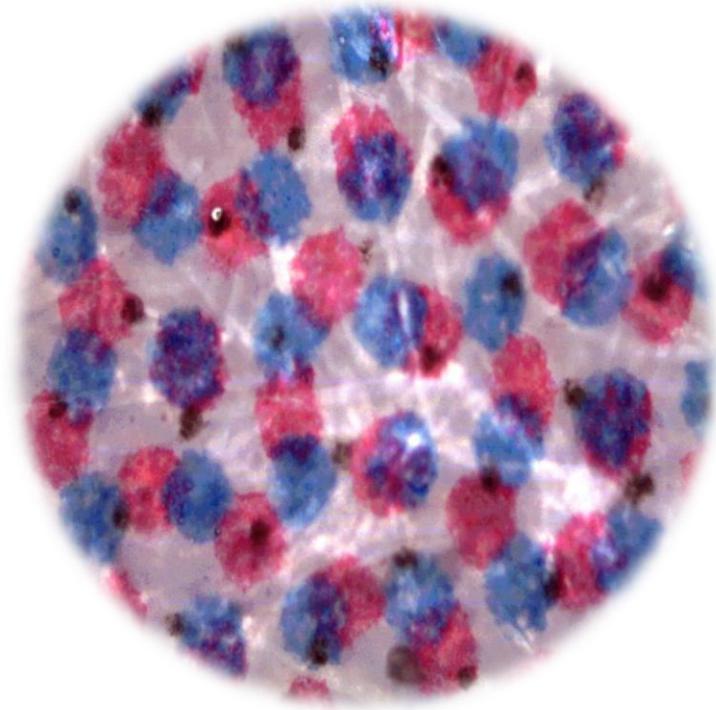


Figura 10. Montaje húmedo de papel fotográfico que permite demostrar el poder de resolución y definición del microscopio óptico. 400X. Fuente: Los autores.

NOTAS

Cada vez que observe con el objetivo de 100X, deberá colocar sobre el cubreobjetos de la preparación, una pequeña gota de aceite de inmersión, la lente del objetivo deberá quedar inmersa en el aceite para tener un mejor resultado. Al retirarlo, absorba el aceite de la lente usando papel seda.



ATENCIÓN: NO OLVIDE LIMPIAR BIEN las lentes antes y después de usarlas.

Evite que su muestra se seque agregando una gota de la solución correspondiente por los bordes del cubreobjetos.

Procedimiento

Verificación preliminar: con el tornillo macrométrico, levante el tubo en tal forma que los objetivos no toquen la platina al girar el revólver. Gire el revólver hasta que el objetivo de menor aumento (el más pequeño) quede alineado con el ocular. Usted sentirá un golpecito cuando el objetivo llegue a la posición de uso. Abra luego el diafragma, vuélvalo a su posición original. Observe por el ocular y haga los ajustes finales hasta que el campo quede uniformemente iluminado. Si hay mucho brillo ajuste el diafragma.

Aumento del microscopio

Al usar el microscopio es importante saber exactamente cuántas veces está aumentando el tamaño del objeto. En cada ocular y objetivo está grabado un número que indica el grado de aumento que proporciona. La multiplicación de estos dos valores nos da el aumento de la imagen. Algunos microscopios tienen un aumento adicional expresado como factor de tubo, en este caso es 1, para dar el aumento de este microscopio se multiplica:

Ej.: **Objetivo = 40X** \implies
Ocular = 6X

Objetivo x Ocular x Tubo

$$6X \times 40X \times 1 = 240X$$

Esto significa que el diámetro de la imagen ha aumentado 240 veces

Preparación de las muestras para observación

Los materiales que se van a observar se colocan sobre una pieza de vidrio llamada portaobjetos o lámina, y la mayoría de veces se cubren con una lámina de vidrio más pequeña y delgada llamada cubreobjetos (o laminilla). Ambas deben limpiarse muy bien antes de usarse.

1. Montaje húmedo de una placa para observar al microscopio: Con unas tijeras corte un pedazo de papel periódico (3 x 3 mm) que contenga una letra "a" ó "e" (impresa por un solo lado); colóquelo en el centro del portaobjetos y con un gotero deposite una gota de agua. Coloque luego el cubreobjetos sobre el papel. Para evitar que queden burbujas coloque el cubreobjetos de tal manera que forme un ángulo de 45° con el portaobjetos y déjelo caer lentamente. Si quedan burbujas ejerza presión suave sobre el cubreobjetos.
2. Una vez verificado que no hay burbujas en el montaje realice una observación de la placa en el objetivo de menor aumento (esto le permitirá realizar un enfoque adecuado de la imagen) y posteriormente realice el enfoque en 10X y 40X; realice los dibujos correspondientes a las imágenes observadas en 10X y 40X
3. En cada uno de los dibujos que presente después de hacer una observación en microscopio deberá incluir el aumento en el cual observó el material.
4. Compare la posición de la imagen de la letra que observó, con su posición real en el portaobjetos. ¿Se ve en la misma posición? Explique el porqué de ese fenómeno.
5. Mueva el portaobjetos en dirección contraria a usted (orientación hacia el brazo del microscopio). ¿En qué dirección se mueve la imagen? ¿Por qué sucede esto?
6. Al sustituir el objetivo de menor aumento por el de mayor aumento, ¿cambia la posición de la imagen? ¿Por qué?
7. Realice un montaje húmedo de papel fotográfico que le será suministrado por el auxiliar de laboratorio.
8. Con respecto al montaje anterior, ¿cuál es la diferencia entre lo observado a simple vista y lo observado al microscopio? ¿Qué poder es evidente en esta observación?
9. Dibuje lo observado teniendo en cuenta las normas del dibujo biológico.
10. Con un hisopo o palillo raspe la superficie interna de la mejilla y frótelo sobre un portaobjetos perfectamente limpio, fijar la placa mediante flameo. Agregue una gota de azul de metileno al 0.2%, durante 1 minuto, lave y seque la placa. Observe al microscopio con el objetivo de 10X, 40X y 100X. Dibuje.
11. Desprenda un fragmento de epidermis de cebolla, déjelo en el portaobjetos cuidando que quede completamente extendido. Coloque el cubreobjetos y por uno de los bordes, adicione cuidadosamente una gota del colorante lugol de Gram, que va entrar por capilaridad a la muestra. Observe con el objetivo de 10X y de 40X. Dibuje.

**Cuestionario**

Esquematice las células de las muestras observadas con el objetivo escogido por el docente, anotando el nombre de la célula, los componentes celulares identificados, así como el aumento total empleado (para lo cual se multiplica el aumento del objetivo por el aumento del ocular).

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Indique la importancia del microscopio de campo claro en la investigación científica.
2. ¿Qué importancia tiene realizar la iluminación de Köhler?
3. ¿Qué cuidados hay que tener al utilizar el aceite de inmersión?
4. Indique los componentes celulares que haya observado en esta práctica en cada muestra. Esquematice siguiendo las normas para dibujo biológico.
5. Diga las diferencias y semejanzas que hay entre las células animales y vegetales.
6. Al sustituir el objetivo de menor aumento por el de mayor aumento, ¿cambia la posición de la imagen? ¿Por qué?
7. ¿Se logró el objetivo de la Práctica? ¿Por qué?

Bibliografía

1. Barrera-Escorcia H., Cárdenas-Reygadas, R. 1997. *El Microscopio Óptico*. Plaza y Valdés Editores. México, D.F.
2. Ducolomb Ivone, Fierro, Reina., González, Cristina., Ortiz Rocio., Rodríguez, Ernesto. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Celular. 2012. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalaca. México.
3. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
4. Keller, E, Goldman, D. R. 2006. Light Microscopy. En: *Basic Methods in Microscopy. Protocols and Concepts from Cells: A*
5. *Laboratory Manual*. Spector D, Goldman RD eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
6. Piña-López, Carmen. Contenido Didáctico del Curso de Biología 210101. 2013. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. 300 páginas.
7. *Zeiss, 2003*. Carl Zeiss. Light Microscopy. Instrucciones de manejo Axiostar Plus. Microscopio de luz transmitida y FL. www.zeiss.de/micro.

5.3. MEDICIONES MICROSCÓPICAS

La unidad de longitud más frecuentemente utilizada en microscopía es la micra (μm) y equivale a una milésima de milímetro ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$ ó $0,001\text{mm}$). Gran cantidad de objetos que los biólogos estudian con el microscopio tienen forma y tamaños definidos. Para hacer observaciones cuantitativas de esas características es necesario utilizar el micrómetro. Si no se dispone de este aparato, se debe tener una manera de medirlas utilizando el microscopio para medir objetos de tamaño tan pequeño que es imposible hacerlo con regla.

Muchos estudiantes confrontan la dificultad para encontrar y estudiar debidamente un espécimen, por cuanto lo buscan y lo observan usando demasiado aumento. Los objetivos de alta potencia no son superiores a los de baja potencia, solo porque magnifican más. Los especímenes grandes se ven perfectamente con bajos aumentos. Trate siempre de localizar el espécimen con el objetivo de menor aumento (3X ó 4X) y luego si es necesario vaya aumentando consecutivamente la observación con el objetivo siguiente.

Objetivos

-  Estimar las dimensiones del campo del microscopio para los objetivos de menor y mayor aumento.
-  Relacionar el tamaño del campo del microscopio con los objetos observados

Materiales y reactivos

-  Microscopio
-  Porta y cubreobjetos
-  Lugol
-  Solución limpiantes
-  Cultivo de levadura
-  Lancetas (1 por grupo)
-  Cápsula de vidrio
-  Solución cristal violeta para coloración de Gram
-  Hojas de Elodea*
-  Tela ojo de pescado o papel limpiantes*
-  Papel de revista*
-  Lápiz*
-  Gotero*
-  Guantes*
-  Tijeras*
-  Pinzas (depilador)*
-  Bisturi o cuchillas de afeitar*
-  Compás*
-  Calculadora*
-  Papel toalla*
-  Marcador de vidrio*
-  Jabón antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes.**

Procedimiento

1. Determinación del aumento total para cada objetivo

El aumento total para cada objetivo es calculado multiplicando el aumento del lente ocular por el aumento del lente objetivo x el lente del tubo (si el tubo de su microscopio señala que tiene aumento). Calcule el aumento total para cada uno de los objetivos de su microscopio.

OBJETIVO	LENTE OCULAR	LENTE OBJETIVO	AUMENTO TOTAL
De exploración			
De bajo poder			
De alto poder			
De inmersión			

2. Cálculo del diámetro del campo visual y área del campo

El campo de visión de un microscopio es la zona circular que se delimita al observar la preparación bajo un determinado aumento. Para medir el campo de visión de un microscopio, se debe usar una unidad llamada micra. Una micra equivale a 0,001 mm; en otras palabras, hay 1000 micras en un milímetro. El diámetro de este campo es su medida. Utilice la fórmula para determinación del diámetro del campo visual para cada uno de los objetivos, realice la conversión respectiva en micras.

Diámetro del Campo visual para un objetivo X en mm = $ICV / A_{objetivo} \times q$

X: puede ser cualquier objetivo
 ICV: Índice del campo visual
 Aobjetivo: Aumento del objetivo
 q: Factor de tubo

Teniendo como base el diámetro del campo visual, determine el área del campo visual de su microscopio, usando la fórmula:

$$\text{Área del campo visual} = \pi r^2$$

El aumento de los objetivos es inversamente proporcional a los diámetros de sus campos, compruebe esto efectuando los cálculos respectivos.

3. Estimación del tamaño celular utilizando el micrómetro

Para medir células y otras muestras al microscopio, es necesario utilizar una regla, al igual que para medir objetos mayores. Con este fin, se utiliza una regla dividida en unidades (Figura 10) que se encuentra en un ocular micrométrico. Las divisiones tienen una longitud indeterminada por lo que es necesario medirlas con una regla de unidades conocidas.

Antes de realizar la medición microscópica de longitudes hay que averiguar el valor del micrómetro o de la escala de la combinación de objetivo/plaquita para el ocular empleado (Figura 11).

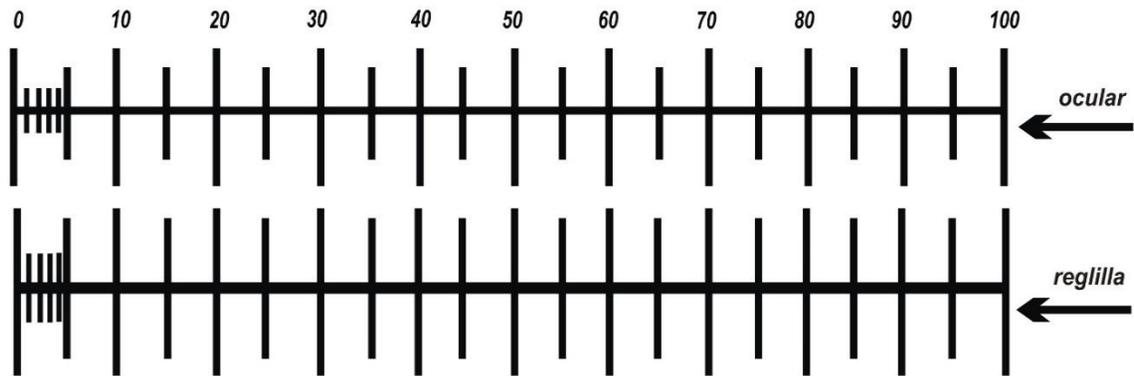


Figura 11. Combinación de las escalas de objetivo y placa para el objetivo empleado.
Fuente: Los autores.

En el preparado, este valor de escala es exactamente el trayecto que equivale a una subdivisión de escala del micrómetro reticular equipado en el ocular.

Para la calibración, las escalas de micrómetro de objeto y del micrómetro reticular se posicionan paralelamente entre sí, para el efecto girar el ocular, y se ponen a coincidir con suma exactitud las líneas de cero de ambas escalas (Figura 12).

Si por ejemplo, tal y como se evidencia en la figura 11,

99 subdivisiones de escala ($10\ \mu\text{m}$ cada una) del micrómetro de objeto equivalen a exactamente 100 subdivisiones de escala del micrómetro reticular, entonces para la combinación de objetivo y plaquita para ocular utilizada (Objetivo A-Plan $10\times/0,25$ y micrómetro reticular $10:100$) resulta un valor de escala K' de:

$$K' = (99/100) \times 10\ \mu\text{M} = 9,9\ \mu\text{M}$$

Después de cambiar el micrómetro de objeto por el preparado que ha de ser medido, el trayecto de medición L buscado se calcula multiplicando la cantidad de subdivisiones de escala del micrómetro reticular para oculares (supuestas las décimas) por el valor de escala K' , de lo cual se obtiene un resultado, por ejemplo:

$$L = 35,5 \times 9,9\ \mu\text{M} = 351,5\ \mu\text{M}$$

Las estructuras de grande tamaño de los preparados también se pueden determinar usando las escalas de nonios ($0,1\ \text{mm}$) dispuestas en la platina en cruz. Para obtener el trayecto de medición deseado eventualmente se debe realizar un cálculo matemático con base en las direcciones X y Y (Pitágoras) (Figura 12).

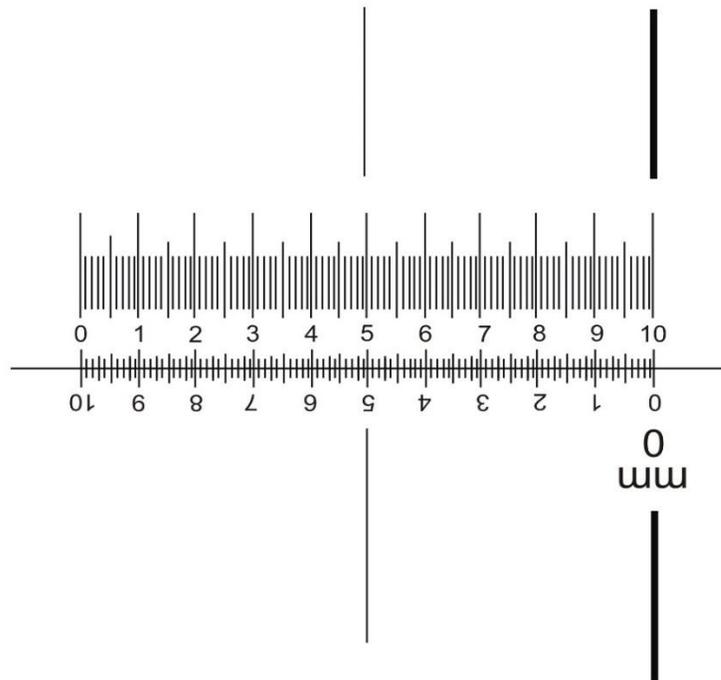


Figura 12. Medición de longitudes. Fuente: Modificada por los autores de Keller, E., Goldman, D. R. 2006. Instrucciones de manejo del microscopio Axiostar Plus. Microscopio de luz transmitida.

En nuestro caso, Para medir longitudes microscópicas con el microscopio Axiostar Plus disponible en el laboratorio, se necesita el micrómetro reticular para oculares 10: 100, d=26 mm (Figura 13).

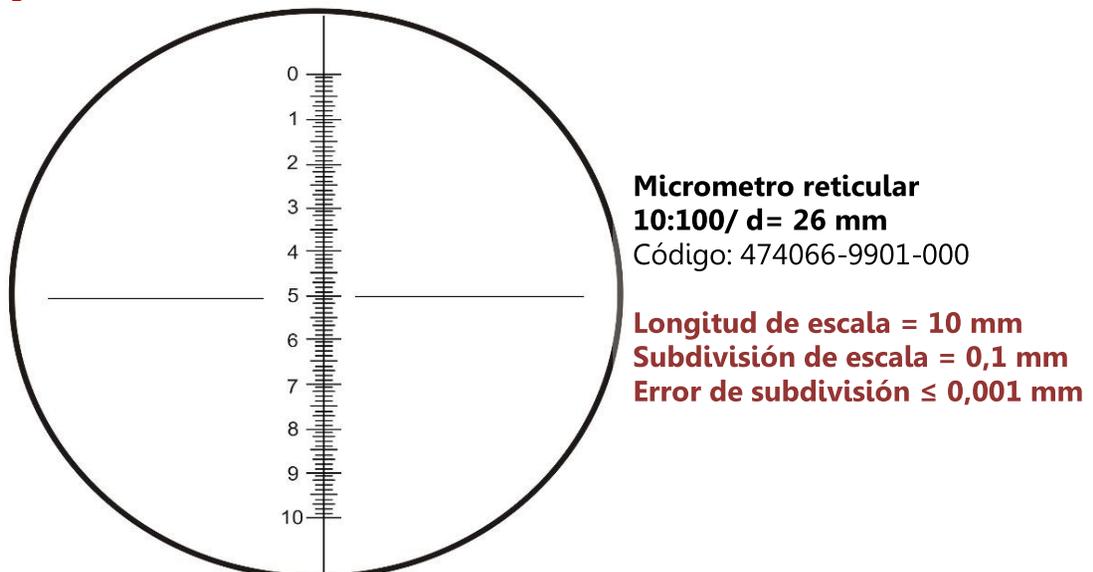
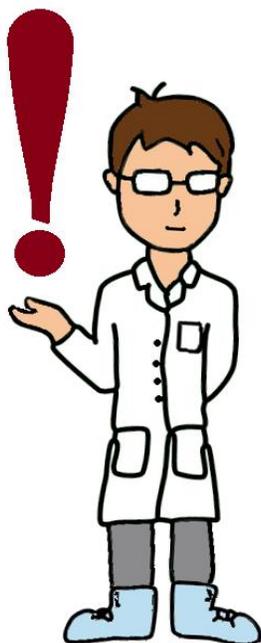


Figura 13. Micrómetro reticular 10:100/ d= 26 mm usado en el laboratorio para determinación del tamaño celular. Fuente: Los autores.



Para realizar la medición de las células de la levadura y eritrocitos, entonces:

1. Cuente las líneas desde el punto cero y cuente el número de divisiones que tiene.
2. Multiplique por el valor de la subdivisión respectiva y divida ese valor por el aumento real del microscopio (ocular x objetivo).
3. El valor es dado en mm, multiplicamos por 1000 para reportar el valor en micras.

Preparaciones en fresco

1. Realice un montaje húmedo de células de elodea, observe en aumento de 10X y 40X. Estime el tamaño aproximado de las células de elodea, teniendo en cuenta los datos encontrados con respecto al microscopio utilizado (diámetro y área del campo visual). Deduzca los cálculos respectivos para la determinación del tamaño celular en la preparación de epidermis de cebolla únicamente.
2. En una cápsula de vidrio colocar 5 mL de reactivo diluido (1/10) de cristal violeta (utilizado para coloración de Gram), adicionar 1ml de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* previamente crecida en caldo, homogenizar y colocar una gota en el portaobjetos para ser observada bajo el microscopio. Estime el tamaño aproximado de las células de levadura, teniendo en cuenta los datos del micrómetro del microscopio que utilizará para esta medición (Longitud de escala 10 mm, subdivisión de escala 0,1 mm, error de subdivisión $\leq 0,001$ mm).
3. Realice un montaje de células sanguíneas (eritrocitos). Observe en aumento de 10X y 40X. Estime el tamaño de los eritrocitos usando el micrómetro.



Cuestionario

1. Esquematice las células de la muestra observada indicando las mediciones realizadas con los objetivos escogidos por su docente, anotando el nombre de la célula, los componentes celulares identificados, así como el aumento total empleado (para lo cual se multiplica el aumento del objetivo por el aumento del ocular).

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica

2. ¿Cuál es la importancia de la calibración en el microscopio?
3. Al observar una misma célula a 10X y a 40X. ¿Hay variaciones en cuanto a sus medidas? Si las hay, ¿a qué pueden deberse?

4. ¿Puede calibrarse el microscopio para observar muestras con el objetivo de 100X o cualquier otro objetivo diferente a los de 10X y 40X? ¿De qué forma se haría?
5. Investigue las medidas de los cloroplastos y de los eritrocitos reportadas en la bibliografía. Compárelas con las obtenidas en esta práctica. Si hay diferencias entre las mediciones, o si no las hay, comente a qué puede deberse.

Bibliografía

1. Barrera-Escorcia, H., Cárdenas-Reygadas, R. 1997. *El Microscopio Óptico*. Plaza y Valdés Editores. México D.F.
2. Ducolomb Ivone, Fierro, Reina., González, Cristina., Ortiz Rocio., Rodríguez, Ernesto. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Celular. 2012. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalaca. México.
3. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
4. Keller, E., Goldman, D. R. 2006. Light Microscopy. En: *Basic Methods in Microscopy . Protocols and Concepts from Cells: Laboratory Manual*. Spector D, Goldman RD eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

5.4. MACROMOLÉCULAS DE LA LEVADURA

Una célula viva está compuesta por un restringido conjunto de elementos, cuatro de los cuales (C, H, N, O) constituyen aproximadamente el 99% de su peso.

La sustancia más abundante de la célula viva es el agua, constituye aproximadamente el 70% del peso de la célula. La mayoría de las reacciones intracelulares ocurren en un medio acuoso. Aparte del agua, la mayor proporción de compuestos presentes en las células son macromoléculas orgánicas. El carbono se destaca entre todos los elementos de la tierra por su capacidad de formar grandes moléculas; debido a su reducido tamaño y a los cuatro electrones de la capa externa, el átomo de carbono puede formar cuatro enlaces covalentes fuertes con otros átomos; y, lo que es más importante, se puede unir otros átomos de carbono formando cadenas y anillos, generando así moléculas grandes y complejas.

Dado que los átomos de carbono se unen muy fácilmente entre sí, el esqueleto básico de casi todos los compuestos orgánicos son cadenas de carbono de diversas longitudes y formas, a las que por lo general se adhieren átomos de hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Entre los compuestos orgánicos más estrechamente asociados con los procesos básicos de la vida están los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos que junto con moléculas orgánicas más pequeñas y moléculas inorgánicas conforman la materia viva en un sistema bastante complejo que interactúa con el ambiente para mantener su integridad estructural y funcional.

Objetivos

- ✿ Diferenciar procedimientos de extracción e identificación básicos de macromoléculas orgánicas.
- ✿ Extraer e identificar cualitativamente las principales macromoléculas presentes en las células de la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*): proteínas, ácidos nucleicos y glucógeno

Materiales y reactivos

- ✿ Mortero
- ✿ Levadura de panadería granulada*
- ✿ Ácido tricloroacético al 5% (P/V)
- ✿ Arena lavada
- ✿ Alcohol etílico a 96%
- ✿ Reactivo de yodo (Iugol)
- ✿ Solución de glucógeno a 0.5%
- ✿ Cloruro de sodio a 10%
- ✿ Cloruro de sodio 0.15M (amortiguador salino)
- ✿ Reactivo de orcinol (bial) fresco
- ✿ Sulfato cúprico 0.1M
- ✿ Hidróxido de sodio 10M
- ✿ Cuchara *
- ✿ Pipetas para cada reactivo
- ✿ Gradilla y pinzas para tubos de ensayo
- ✿ Tubos para centrífuga (2 por grupo)
- ✿ Centrífuga
- ✿ Tubos de ensayo
- ✿ Baño serológico hirviendo
- ✿ Baño de hielo
- ✿ Solución de Albúmina o caseína a 10%
- ✿ Solución de almidón a 5%
- ✿ Solución de ribosa a 0,5%
- ✿ Papel toalla*
- ✿ Marcador de vidrio*
- ✿ Jabon antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes.**

Obtención e identificación de Glucógeno

1. En un mortero coloque el equivalente a una cucharadita de levadura de panadería. Agregue arena lavada (lo que quepa en la punta de la cucharadita), y triture cuidadosamente durante 5 minutos.
2. Agregue 10 ml de ácido tricloroacético a 5% y macere por 3 minutos más.
3. Deje que la arena se sedimente y transfiera la suspensión sobrenadante dentro de un tubo de centrifuga. Centrifugue durante 5 minutos a 1000g (3000 r.p.m. aproximadamente). El sedimento contendrá ácidos nucleicos y proteínas y el sobrenadante contendrá glucógeno.
4. Transfiera el sobrenadante en otro tubo y el tubo con el sedimento consérvelo en baño sobre hielo para su uso posterior.
5. Precipite el glucógeno añadiendo al volumen del sobrenadante 2 volúmenes de alcohol etílico a 96% frío, agite y mantenga el recipiente en el baño de hielo. Deje reposar por 5 minutos. Observe si se presenta cambio en la apariencia del sobrenadante.
6. Traslade la suspensión a un tubo de centrifuga. Centrifugue por 3 minutos a 1500g (5000 r.p.m., aproximadamente). Elimine el sobrenadante y disuelva el sedimento en 1 ml de agua destilada.
7. Marque 4 tubos de ensayo diferentes, en A coloque 1 ml de agua destilada sola (control negativo), en B 1 ml de solución de almidón al 0.5% y en C 1 ml de glucógeno (control positivo) y en D 1ml de la solución que obtuvo en el paso anterior (muestra).
8. A cada tubo agregue 2-3 gotas de lugol, agite y compare y registre la coloración observada en los tubos.

Obtención e identificación de Proteínas

1. Tome el sedimento de ácidos nucleicos y proteínas y agréguele 10 ml de cloruro de sodio a 10%, agite cuidadosamente.
2. Caliente la suspensión resultante en baño de agua hirviendo por 10 minutos, deje enfriar y transfiera a un tubo de centrifuga.
3. Centrifugue por 3 minutos a 1500g (5000 r.p.m. aproximadamente). El sedimento contendrá las proteínas y el sobrenadante los ácidos nucleicos.
4. Transfiera el sobrenadante a otro tubo de ensayo y conserve en hielo para su posterior uso
5. Tome el precipitado proteico y resuspéndalo en 2 ml de solución de cloruro de sodio 0.15M, marque ese tubo con la palabra "muestra". En otro tubo coloque 2 ml de solución salina (cloruro de sodio 0.15M) y 1ml de solución de albúmina o caseína, marque ese tubo como "control positivo" y en otro tubo coloque solución salina sola y márkelo como "control negativo".
6. Añada a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato cúprico 0.1M y 2 ml de hidróxido de sodio 10M. Mezcle bien. Observe y registre los cambios de color.

Identificación de ácidos nucleicos

1. Tome la muestra de ácidos nucleicos conservada en hielo y añada 2 volúmenes de alcohol a 96% frío, agite y mantenga sobre hielo por 5 minutos.
2. Centrifugue por 3 minutos a 1500g (5000 r.p.m., aproximadamente), elimine el sobrenadante y disuelva el sedimento en 2 ml de cloruro de sodio 0.15M (Muestra), en otro tubo de ensayo coloque 2 ml de cloruro de sodio 0.15M solo (Control Negativo) y en un tubo adicional 2ml de solución de ribosa al 0,5% (control positivo)
3. Agregue a cada uno de los tubos 3 ml de reactivo de orcinol (Bial), caliente en baño de agua hirviendo durante 20 minutos o hasta cuando aparezca un color verde intenso en el tubo control y en la muestra. Observe y registre los cambios de color.



Cuestionario

1. Elabore un diagrama de flujo en el que resuma y consolide de forma clara el procedimiento realizado y señale puntualmente en cada paso la obtención de cada una de las macromoléculas estudiadas.
2. Elabore un cuadro de resultados en el que registre de manera clara las observaciones de esta práctica que le permitieron identificar las macromoléculas de estudio.

Macromolécula	Control positivo	Muestra	Control negativo	Control adicional
Glucógeno				
Proteínas				
Ácidos nucleicos				

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica

3. Señale las características e importancia biológica de las macromoléculas estudiadas en esta práctica
4. Explique los fundamentos de técnicas de estudio de macromoléculas utilizadas en esta práctica, señalando de manera puntual en que procedimiento se utilizaron (para que se usaron: maceración, centrifugación, decantación, ebullición).
5. Explique el fundamento de las siguientes técnicas: Reacción de Lugol, Reacción de Biuret, reacción de Bial y de manera particular como le permitieron identificar las macromoléculas de levadura estudiadas, puntualice las características de esas macromoléculas.
6. Explique porque se deben usar "controles positivos" y "controles negativos" en este tipo de experimentos. Con base en la fundamentación anterior, explique de manera puntual el porqué de cada uno de los controles positivos utilizados en esta práctica.
7. ¿Qué función cumple el control adicional de almidón en el caso de detección de glucógeno?

Bibliografía

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona.
2. Bravo M. Enrique. 1995. Curso de Biología Celular. Programa temático, guías de estudio y laboratorio. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
3. Cambell P., Smith A., Peters T., 2006. *Bioquímica Ilustrada*. Mason S.A. Barcelona. Link: http://books.google.cl/books?id=Iz15BaZtfJEC&printsec=frontcover&dq=libros+de+bioquimica&hl=es&sa=X&ei=c7f_UbvHJaasiqLy54HoCg&ved=0CEcQ6AEwBA#v=onepage&q=libros%20de%20bioquimica&f=false
4. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
5. Lodish H. Berk A et al. 2008. *Molecular cell biology. 5ta edición*. W. H. Freeman and Company. New York.
6. Nelson D. y Cox M. 2006. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 4ªEd. Editorial Omega.

5.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Una de las funciones más importantes de las proteínas consiste en actuar como enzimas, catalizando reacciones químicas determinadas. Las enzimas son las unidades funcionales del metabolismo celular que actúan en secuencias organizadas catalizando centenares de reacciones escalonadas mediante las que se degradan las moléculas de los nutrientes, se conserva y se transforma la energía química y se sintetizan nuevas macromoléculas a partir de precursores simples. Químicamente las podemos definir como unidades proteicas solubles en agua y que se precipitan por acción del alcohol.

Las enzimas actúan de modo específico en reacciones concretas, diferenciándose esta especificidad según su actuación ante una sustancia (sustrato) determinada, o bien sean específicas a un tipo de enlace químico determinado, propio de un grupo de sustancias.

En toda reacción enzimática intervienen dos elementos: la enzima y el sustrato o sustancia que se transforma en otro producto (o en varios productos) mediante una reacción catalizada por la enzima en un proceso que se puede resumir así: la enzima se une a una molécula del sustrato para formar transitoriamente un complejo enzima-sustrato, que luego se descompone en los productos de la reacción dejando nuevamente libre la enzima. A medida que aumenta la concentración del sustrato, la actividad catalítica de la enzima aumenta en forma hiperbólica hasta alcanzar su velocidad máxima característica, momento en que toda enzima se halla saturada, es decir, formando el complejo enzima-sustrato. Cada enzima posee un pH y temperatura óptimos para su actividad, por encima o por debajo de ellos su actividad se ve reducida e incluso puede llegar a ser nula a causa de un proceso de desnaturalización.

Objetivos

- ✓ Determinar características básicas de la reacción de hidrólisis del almidón catalizada por la amilasa salival.
- ✓ Asociar el efecto de la concentración de la enzima, la temperatura y el pH sobre la reacción de degradación de almidón.

Materiales y reactivos

- ✓ Tubos de ensayo (10 por grupo)
- ✓ Gradilla para tubos
- ✓ Erlenmeyer de 100 ml (4 por grupo)
- ✓ Plaquetas de porcelana (2 por grupo)
- ✓ Goteros (2 por grupo) *
- ✓ Pipetas de 5 ml (1 para cada reactivo)
- ✓ 1 probeta de 100 ml
- ✓ Cronómetro*
- ✓ Papel indicador de pH
- ✓ Solución de almidón al 0,5% + NaCl a 0,25%
- ✓ Amortiguadores de pH: (3,0) (5,0) (7,0) (8,0) (10,0)
- ✓ Reactivo de lugol
- ✓ Saliva*
- ✓ Baño de 37 °C
- ✓ Baño de 60 °C
- ✓ Baño de agua hirviendo
- ✓ Baño de hielo

-  1 beaker de 50 ml
-  1 termómetro
-  Guantes*
-  Papel toalla*
-  Marcador de vidrio*
-  Jabón antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

Velocidad de Reacción vs. Concentración de la Enzima

1. Estimule el flujo de saliva y colecte 10 ml en una probeta de 100 ml.
2. Con ayuda de una probeta y depositando las soluciones en el erlenmeyer de 100 ml realice una serie de diluciones de la saliva con agua de la llave:

Dilución	Concentración de saliva (% V/V)
10 ml de saliva + 90 ml de agua	10% (Dilución 1/10)
50 ml de solución al 10% + 50 ml de agua	5 %
20 ml de solución al 10% + 80 ml de agua	2 %
10 ml de solución al 10% + 90 ml de agua	1 %



ATENCIÓN: Es fundamental que para el buen desarrollo de la práctica no se cambien las pipetas de un reactivo a otro.

3. Mida a temperatura ambiente la actividad de las cuatro diluciones de saliva de la siguiente manera:
 - a. En las placas de porcelana agregue una gota a cada pozo de solución de yodo (Figura 14).
 - b. En un tubo de ensayo (tubo 1) vierta 2 ml de amortiguador de pH 7.0 y 2 ml de la suspensión de almidón al 0.5%. Pruebe la presencia de almidón sacando una gota de la suspensión de este tubo y agréguela en uno de los pozos de la placa de porcelana. Verifique que dé el color azul intenso característico como "blanco de reacción"
 - c. En otro tubo (tubo 2) vierta 1 ml de solución de saliva al 10% (Figura 14).
 - d. Registre el tiempo cero (0) en su cronometro e **inmediatamente** vierta el contenido del tubo con el almidón (tubo 1) en el tubo que contiene la saliva al 10% (tubo 2), agite y comience la medición del tiempo de la reacción; para ello cada 10 segundos saque una gota del tubo de la mezcla y colóquela en un pozo con yodo de la plaqueta de porcelana.
 - e. Continúe la prueba cada 10 segundos hasta que el color sea igual al de la solución de yodo, este será el indicio de que la reacción ha terminado. Escriba el dato del tiempo en minutos transcurrido desde el comienzo hasta el final de la reacción y calcule la velocidad como el inverso del tiempo $1/t$ en min^{-1} .
4. Repita el mismo procedimiento con las demás diluciones de saliva (5%, 2%, 1%). Dependiendo de las velocidades de reacción, se pueden alargar los intervalos de tiempo entre las pruebas.
5. Registre cada uno de los datos obtenidos tanto en minutos como en (min^{-1}) .

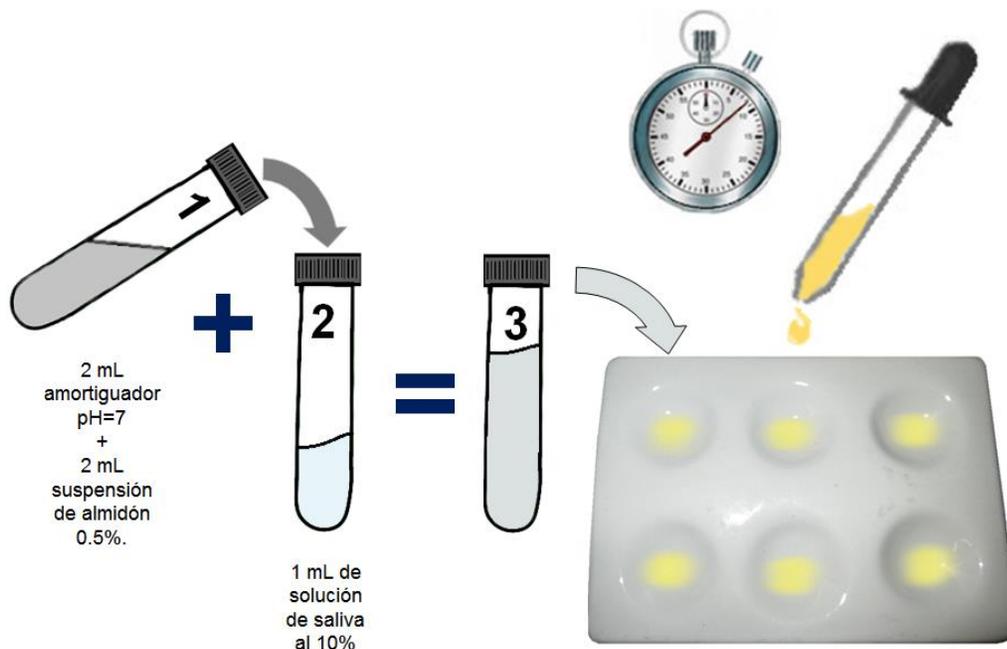


Figura 14. Determinación de la actividad enzimática a temperatura ambiente. Fuente: Los autores.

Velocidad de Reacción vs. Temperatura

1. Determine los tiempos de reacción de la hidrólisis del almidón a pH 7.0, para ello utilice la saliva de concentración del 5% a diferentes temperaturas: baño de hielo, temperatura ambiente, 37°C, 60°C y baño de agua hirviendo.
2. Prepare una placa de porcelana con gotas de yodo.
3. Para ello en un tubo de ensayo (tubo 1) vierta 2 ml de amortiguador de pH 7.0 y 2 ml de la suspensión de almidón a 0.5%, en el tubo 2, adicione 1 mL de saliva a 5% y mantenga estos dos tubos en el baño de la temperatura a evaluar por 5 minutos.
4. Manteniendo siempre los tubos de reacción en el baño de temperatura a evaluar registre el tiempo cero (0) en su cronómetro e **inmediatamente** vierta el contenido del tubo con el almidón (tubo 1) en el tubo que contiene la saliva al 5% (tubo 2), agite y comience la medición del tiempo de la reacción; para ello cada 10 segundos saque una gota del tubo de la mezcla y colóquela en un pozo con yodo de la plaqueta de porcelana.
5. En las temperaturas extremas (0 grados y ebullición) la reacción puede transcurrir muy lentamente, realice estos ensayos de manera simultánea con intervalos de 1 a 5 minutos y por un máximo de 20 minutos.
6. Registre los datos obtenidos en cada reacción tanto en minutos como en min^{-1} .

Velocidad de Reacción vs. pH

1. Siguiendo el mismo procedimiento de los experimentos anteriores determine el tiempo de reacción a pH de 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 10.0 utilizando la solución de saliva al 5% a temperatura ambiente o a 37°C.
2. En los valores de pH extremos, la reacción puede ser muy lenta. Realice estos ensayos de manera simultánea con intervalos de uno a cinco minutos y por un máximo de 20 minutos.
3. Registre los datos obtenidos en cada reacción tanto en minutos como en (min^{-1}) .

**Cuestionario**

1. Con los datos obtenidos realice las siguientes graficas: velocidad de reacción vs. concentración de la enzima; velocidad de reacción vs. temperatura y velocidad de reacción vs. pH. En cada una de ellas señale la condición "óptima" para la reacción.
2. Elabore una tabla comparativa en la que registre los datos de su grupo y de dos grupos más. Con base en estos resultados señale las similitudes y diferencias encontradas y explique el porqué de estas observaciones.

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

3. ¿Qué es una enzima y cuál es la importancia biológica de estas moléculas?
4. ¿Qué es una cinética enzimática y que factores fisicoquímicos son fundamentales para lograr la velocidad máxima de catálisis de reacciones?
5. ¿Coinciden los resultados obtenidos en esta práctica con los parámetros óptimos reportados en literatura para amilasa salival? Justifique su respuesta argumentando la actividad fisiológica de esta enzima.
6. ¿Qué sucede cuando una enzima humana es sometida a temperaturas extremas (congelación-ebullición)?
7. Es correcta la afirmación: "**Cada enzima posee sus propios parámetros de pH, concentración y temperatura para alcanzar la máxima velocidad de reacción**". Justifique su respuesta con un ejemplo en el que compare 2 enzimas diferentes.
8. Con relación al sustrato la velocidad de reacción se rige por los principios de la cinética de Michaelis-Menten. Explique los fundamentos de esta cinética y defina K_m , $\frac{1}{2} V_{max}$ y V_{max} .

Bibliografía

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona.
2. Bravo M. Enrique. 1995. Curso de Biología Celular. Programa temático, guías de estudio y laboratorio. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
3. Cambell P., Smith A., Peters T., 2006. *Bioquímica Ilustrada*. Mason S.A. Barcelona. Link: http://books.google.cl/books?id=Iz15BaZtfJEC&printsec=frontcover&dq=libros+de+bioquímica&hl=es&sa=X&ei=c7f_UbvHJaasiqLy54HoCg&ved=0CEcQ6AEwBA#v=onepage&q=libros%20de%20bioquímica&f=false
4. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
5. Lodish H. Berk A et al. 2008. *Molecular cell biology. 5ta edition*. W. H. Freeman and Company. New York.
6. Nelson D. y Cox M. 2006. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 4ªEd. Editorial Omega.

5.6. OBSERVACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS PROCARIOTAS

La célula es la unidad fundamental de la vida. Una célula aislada es una entidad separada de otras por una membrana, la cual, forma un compartimento que es necesario para mantener una proporción correcta de constituyentes internos de la célula y para protegerlos de fuerzas externas. Muchas células contienen además una pared celular exterior a la membrana (Brock, 2009).

Células Procariotas. Incluye toda la diversidad de bacterias existentes. Las bacterias pertenecen al Dominio Bacteria (Woese CR 1996; 2005); reino Bacteria (Margulis, 1996; Cavalier-Smith, 1981). Se presenta diferenciación celular incipiente en algunos grupos. Las bacterias carecen de organelos membranosos internos y por lo tanto su membrana celular cumple funciones importantes de transporte, metabolismo, crecimiento y comunicación.

Estos microorganismos contienen una membrana celular o citoplasmática única; Una pared celular formada principalmente por *peptidoglucano* (PG), llamada *pared bacteriana*, cuya química y organización está bien diferenciada en bacterias: Gram positivas y Gram negativas (Figura 14 (a), en éstas últimas a menudo se forma, una envoltura externa adicional que recibe el nombre de *cápsula bacteriana*.

Muchas bacterias son heterótrofas y metabolizan materia orgánica ya elaborada por otros organismos, aunque también existen bacterias autótrofas quimiosintéticas y fotosintéticas tales como las cianofíceas (algas verde-azules) que contienen tilacoides ricos en clorofila, carotenoides y pigmentos azules y rojos. Algunas bacterias crecen de vida libre, pueden habitar ambientes extremos (Extremófilas) o permanecer dentro de animales de sangre caliente (Ej. enterobacterias); otras pueden favorecer ciclos biogeoquímicos y la fertilidad de los suelos tales como las fijadoras de Nitrógeno, Carbono y solubilizadoras de Fósforo. Las bacterias pueden aislarse y cultivarse en laboratorio y es esta propiedad la que ha permitido importantes avances en Biología celular y molecular, medicina, agricultura y medio ambiente.

Coloración Gram: Desarrollada en 1883 por CHRISTIAN GRAM en Dinamarca. Es uno de los métodos más útiles empleados en microbiología ya que por medio de este es posible dividir a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram Negativas.

Fundamento de la coloración Gram:

Cristal Violeta:	Colorante Primario
Solución de Yodo:	Mordiente
Alcohol Acetona:	Decolorante orgánico
Safranina:	Colorante Secundario

Para explicar el mecanismo de la tinción de Gram se ha propuesto la siguiente hipótesis: Hay un elevado contenido graso en las paredes de bacterias Gram negativas, cuyo porcentaje asciende hasta un 20%. Se ha demostrado que, en el procedimiento de tinción, el alcohol cetona, extrae la grasa aumentando la porosidad o permeabilidad de la pared celular. El complejo cristal violeta yodo se extrae así por el alcohol acetona y el microorganismo se decolora; al tratarlo con safranina vuelven a tomar el colorante.

La pared de bacterias Gram positivas, por su composición química (Figura 15), se deshidrata por el alcohol, el tamaño de los poros disminuye, se reduce su permeabilidad y el complejo cristal violeta - yodo no se extrae; La respuesta a la coloración de Gram es variable en cultivos viejos de bacterias Gram positivas (azules), entretanto, las bacterias Gram negativas (rosadas) no son variables.

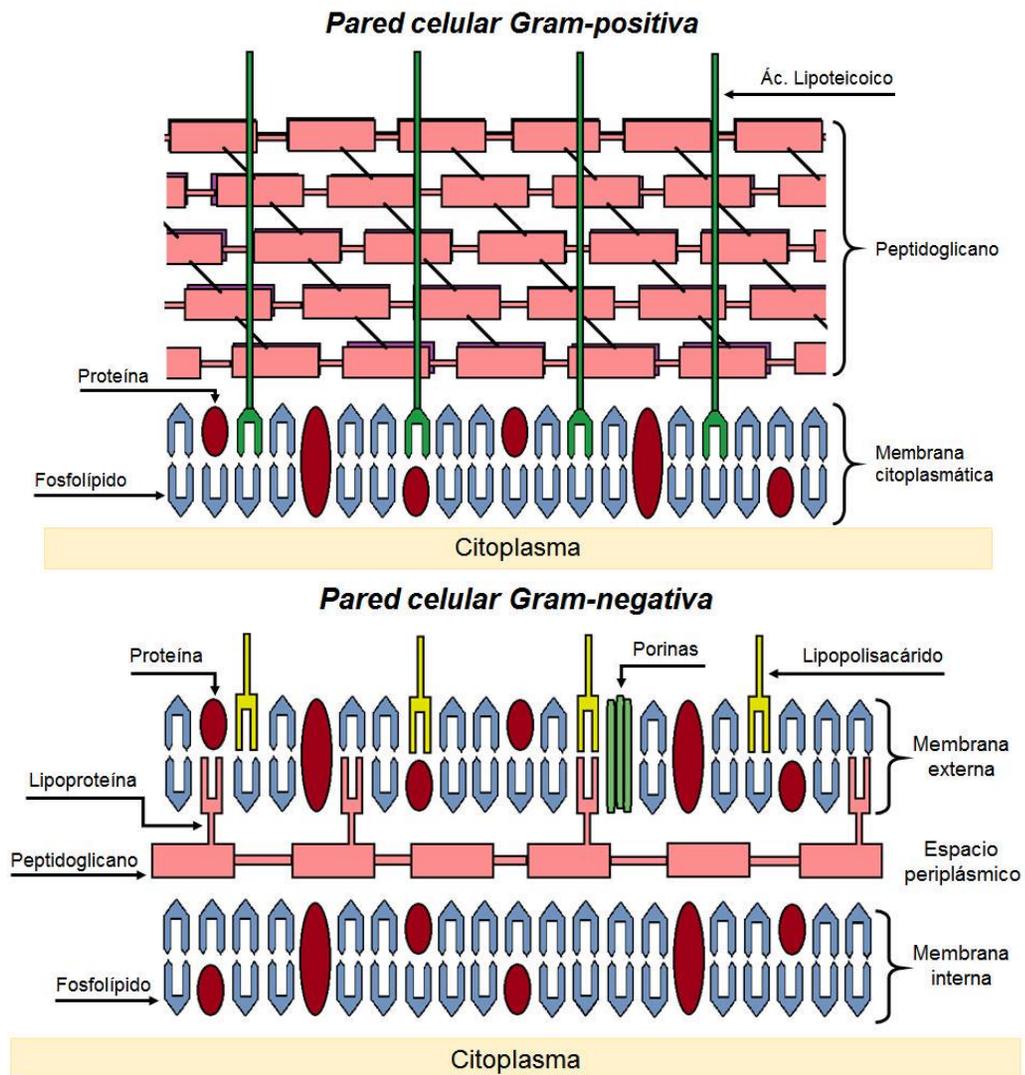


Figura 15. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Fuente: Los autores.

De acuerdo con su morfología microscópica, se pueden diferenciar formas cocoides (cocos), bacilares (bacilos), bacilares curvos (vibrios y demás bacilos curvos), espirilares (espirilos), figura 16 (a).

Así mismo, las bacterias pueden encontrarse de forma individual o agrupados diplococos o diplobacilos, Estreptococos o bacilos (un plano de división), tétradas, sarcinas, Estafilococos (dos o más planos de división), Empalizada (en V o L) letras chinas y rosetas, figura 16 (b) y (c).

Injuria bacteriana: Este fenómeno consiste en daños subletales a nivel de rRNA que cambia la fisiología bacteriana causando la pérdida de la integridad de la membrana celular y por consiguiente el desperdicio de una gran variedad de constituyentes intracelulares. Este daño puede ser causado por radiaciones, deshidratación, congelación o temperaturas cercanas al punto de ebullición. A nivel molecular la injuria bacteriana consiste en fenómenos a nivel intracelular: la inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico y la degradación de material ribosomal. La inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico

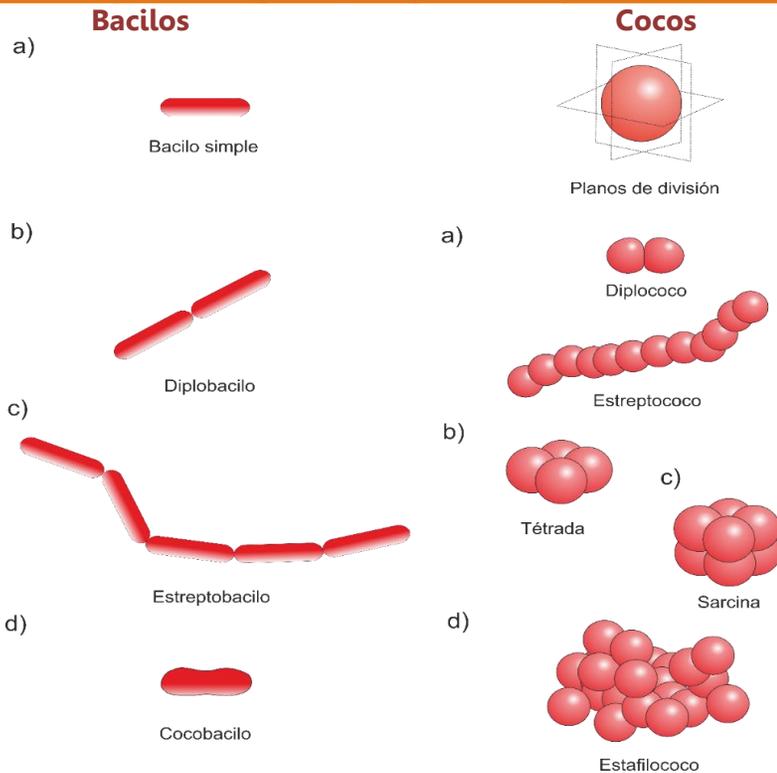
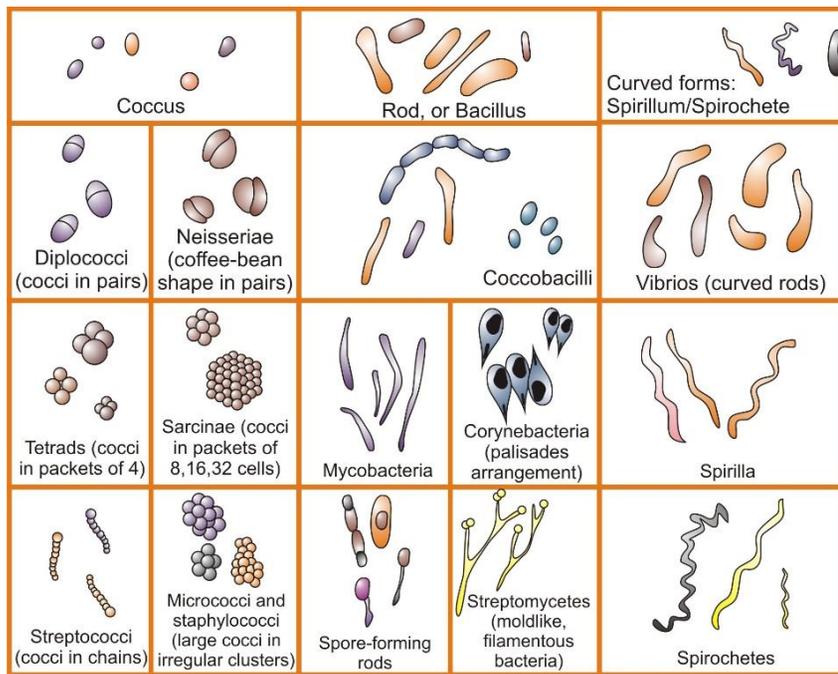


Figura 16. Diversidad de formas bacteriana. Fuente: Los autores.

Injuria bacteriana: Este fenómeno consiste en daños subletales a nivel de rRNA que cambia la fisiología bacteriana causando la pérdida de la integridad de la membrana celular y por consiguiente el desperdicio de una gran variedad de constituyentes intracelulares. Este daño puede ser causado por radiaciones, deshidratación, congelación o temperaturas cercanas al punto de ebullición. A nivel molecular la injuria bacteriana consiste en fenómenos a nivel intracelular: la inducción de la síntesis de proteínas de choque

térmico y la degradación de material ribosomal. La inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico (*HSP*) puede presentarse antes o durante la aplicación de calor y conlleva a otros factores adversos (Bautista B, 2009).

La injuria bacteriana conlleva a la degradación completa de la partícula ribosomal 30s y una ligera alteración de la partícula 50s. Estas dos partículas conforman el ribosoma el cual es responsable de la síntesis de proteínas en la célula. Durante un procedimiento de choque térmico a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* se ha encontrado que el RNA 23s, asociado con la partícula ribosomal 50s, permanece intacto mientras el 16s, asociado con la partícula ribosomal 30s es degradado por completo (Witter, 1981). El medio de recuperación juega un papel fundamental ya que las células injuriadas pueden repararse y crecer en un medio nutritivo, pero son incapaces de desarrollarse en un medio selectivo debido al incremento en la sensibilidad a reactivos químicos usados para aumentar la selectividad en los medios de cultivo (Zwietering, 2006).

Objetivos

- ☞ Identificar características generales de la morfología y agrupación bacteriana.
- ☞ Con base en el proceso de tinción Gram comprobar las principales diferencias en la pared celular bacteriana.
- ☞ Reconocer y diferenciar procesos conducentes a injuria bacteriana.

Materiales y reactivos

- ☞ Microscopio
- ☞ Solución de cristal violeta
- ☞ Mechero
- ☞ Fucsina
- ☞ Cajas de Petri (con bacterias Gram positivas y negativas)
- ☞ Solución lugol
- ☞ Asas bacteriológicas
- ☞ Glicerina
- ☞ Rejilla para portaobjetos
- ☞ Alcohol etílico 96%
- ☞ Mortero
- ☞ Aceite de inmersión
- ☞ Portaobjetos
- ☞ Laminillas
- ☞ 2 tubos de ensayo 9 ml de caldo tioglicolato estéril
- ☞ 2 cajas de Petri con medio de cultivo EMB estéril
- ☞ Termómetro
- ☞ Baño María
- ☞ Micropipeta de 1ml y puntas estériles
- ☞ Yogurt*
- ☞ Fósforos*
- ☞ Gotero*
- ☞ Reloj con segundero*
- ☞ Papel vinilpel*
- ☞ Cinta de enmascarar*
- ☞ Tapabocas obligatoriamente para cada uno de los estudiantes*
- ☞ Guantes de nitrilo*
- ☞ Marcador de vidrio*
- ☞ Papel toalla*
- ☞ Jabón antibacterial para lavado de manos*

*** Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes.**

Procedimiento y registro de resultados**Descripción de bacterias: morfología y agrupación**

1. Se utilizarán placas previamente teñidas de bacterias: cocos, bacilos y cocobacilos, Gram positivos y Gram negativos, individuales y con agrupación.
2. Se tomará cada placa y se llevará a microscopio para su observación con el objetivo de inmersión.
3. Se realizará la observación y descripción detallada de lo observado. Para completar la tabla utilice el gráfico de resultados.
4. Se deberán realizar dibujos utilizando $\frac{1}{4}$ del campo visual.

Bacteria	Morfología	Coloración Gram	Agrupación	Nombre de la bacteria
1				
2				
3				
4				

Protocolo general de tinción de Gram

1. Cubra la superficie del portaobjetos con la solución de cristal violeta durante un minuto (Figura 17).
2. Realice un lavado con agua corriente para eliminar exceso de colorante; evite que el chorro de agua caiga directamente sobre la muestra.
3. Cubra el preparado con lugol durante un minuto.
4. Realice un lavado similar al del numeral 2.
5. Con mucho cuidado lave la superficie con unas gotas de decolorante alcohol hasta eliminar el excedente de cristal violeta (10 segundos).
6. Repita lavado con agua corriente.
7. Cubra la superficie de la muestra con safranina durante 30 segundos.

8. Lave con agua corriente y deje secar al aire libre.
9. Examine el preparado al microscopio con objetivo de 100X haciendo uso del aceite de inmersión.
10. Dibuje los resultados observados (de todos los montajes en 100 X).

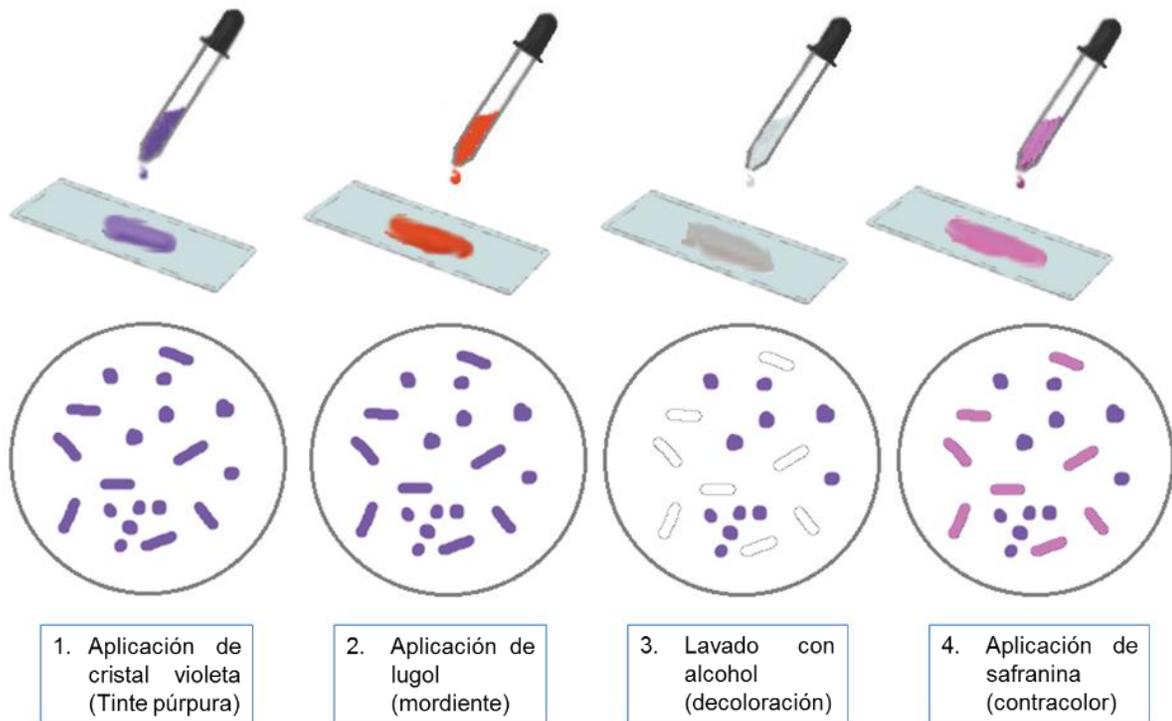


Figura 17. Esquema de la coloración de Gram. Fuente: Los autores.

Fijación y coloración bacteriana a partir de cultivo sólido (caja de Petri)

1. Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado se coloca con el asa una muestra pequeña de material de estudio (caja de petri 1) (Figura 18).
2. Se agrega una gota de agua con la cual se diluye la muestra.
3. Se extiende en forma circular para formar una película muy fina de 10 a 20 mm de diámetro. Entre más fina sea la película el resultado es mejor.
4. Una vez hecho el frotis pase tres o cuatro veces el portaobjetos por la llama de un mechero para fijar la preparación. Tenga cuidado de no quemar la muestra.
5. Posteriormente realice el procedimiento de tinción de Gram que aparece en el Protocolo general de tinción de Gram.
6. Realice el mismo procedimiento con la muestra de la caja 2.

Fijación y coloración bacteriana con muestra de bebida láctea: (líquido)

1. Coloque sobre el portaobjetos una gota de bebida láctea (Ej: Yox) con un palillo, añada una gota de agua y mezcle para homogeneizar.
2. Pase tres o cuatro veces el portaobjetos por la llama de un mechero para secar la preparación;
3. cubra todo el portaobjetos con alcohol, déjelo así por 5 a 8 segundos.
4. Pasado esto, escurra el exceso de alcohol y deje secar al aire, luego realice el protocolo general de tinción de Gram (numeral 2).

Reconocimiento de injuria bacteriana.

Se recomienda iniciar este protocolo lo más rápido posible para incubar oportunamente y obtener todos los datos esperados.

1. Se utilizarán cultivos puros de *Escherichia coli*, en medio líquido, de 12 horas de incubación (cultivo joven) y repique de ser necesario, 3 horas antes del laboratorio, para controlar el crecimiento.
2. Se tomará 0,1 ml (con micropipeta) de cultivo bacteriano y se depositará en un tubo con 9 ml de caldo tioglicolato. Agitar suavemente.
3. Se llevará a incubación durante 2 horas a temperaturas de 50°C y 90°C. Se deberá comprobar con termómetro la temperatura de incubación, cada 20 minutos.
4. Posterior a la incubación se tomarán 0,1 ml de cultivo sometido a cada temperatura y se depositarán en portaobjetos
5. El mismo procedimiento se realizará utilizando una cepa control de *E. coli* cultivada previamente a 37°C.
6. Se procederá a realizar la coloración Gram. Numeral 2.
7. Se realizará la observación y descripción microscópica. Completar la tabla de resultados.
8. **Paso adicional:** Tomar 0,1 ml de cada tubo y depositar en caja de petri con medio de cultivo sólido, distribuir con rastrillo de vidrio e incubar a 37 °C por 24 horas, al cabo de ese tiempo ir al laboratorio, observar si hay crecimiento (colonias) o ausencia del mismo, tomar fotografía y describir lo observado.
9. Con estos resultados ampliar la discusión acerca del efecto del procedimiento sobre las bacterias y las razones que llevaron a tales resultados.

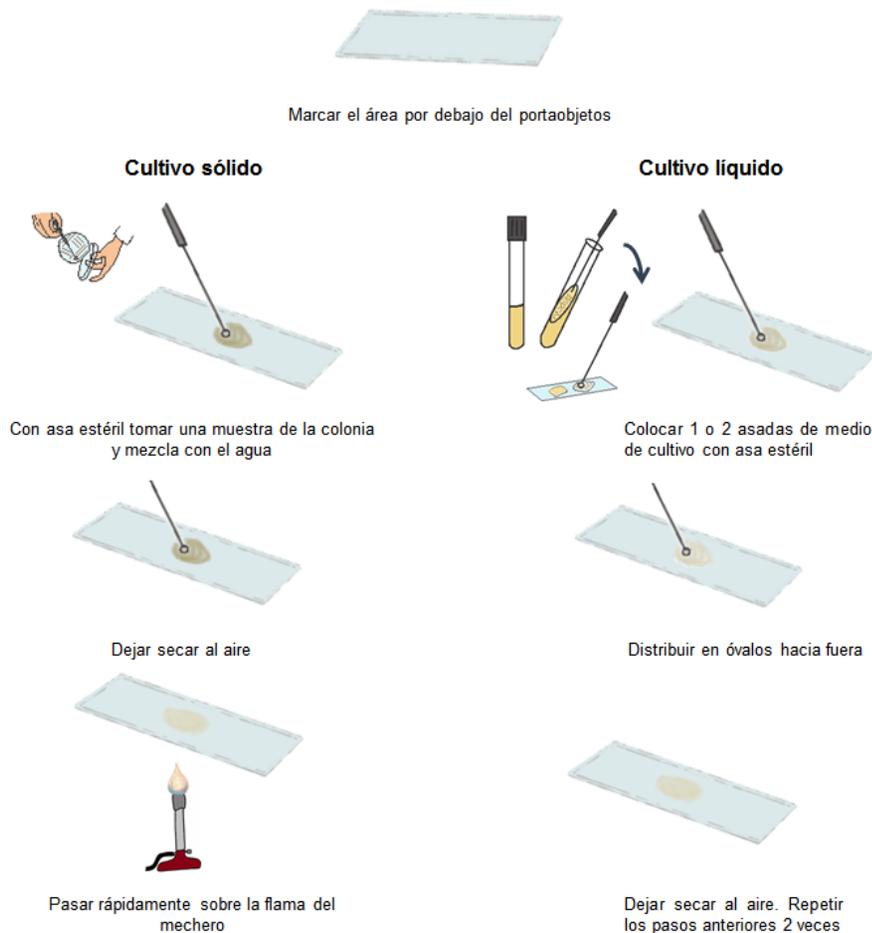


Figura 18. Preparación y fijación de frotis bacterianos a partir de cultivos sólidos y líquidos. Fuente: Los autores.

<i>E. coli</i> incubada a	Morfología	Gram	Discusión de resultados
37°C			
50°C			
90°C			



Cuestionario

1. ¿Cuál (es) son las razón (es) por las que un cultivo bacteriano "viejo" puede alterar los resultados de la coloración de Gram? Argumente su respuesta.
2. ¿Cuál es la influencia o el papel de los microorganismos en la actividad humana?
3. Explique con un ejercicio el desarrollo de anormalidad (injuria) bacteriana y ¿qué papel juegan las estructuras de resistencia y adaptación bacteriana (celulares y genómicas)?
4. ¿Por qué la evolución de las cianobacterias cambió la Tierra de modo permanente? (Consultar libro: Biología de los microorganismos Thomas D. Brock).
5. ¿Cómo convencería a un amigo de que los microorganismos son mucho más que meros agentes causantes de enfermedades? (Consultar libro: Biología de los microorganismos Thomas D. Brock).

Bibliografía

1. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
2. Bautista B. Evaluación en 3 microambientes diferentes de la termorresistencia de una cepa de Salmonella spp aislada de compost. Tesis de Microbiología. Universidad Javeriana. 2009.
3. Biología de los microorganismos. Thomas D Brock, Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker, Miguel Sánchez Pérez. Pearson Educación; 12a Edición. Enero, 2009.
4. La célula. Geoffrey M cooper y Robert E. Haussman. 5ª Ed-Marban. 2009.
5. Cavalier-Smith T. Eukaryote Kingdoms: Seven or Nine?. *Biosystems*, 14 (1981) 461--481 461
6. Gram's discovery of his staining technique. *Journal of Infection*, Volume 7, Issue 2, Sep 1983, 97–98.
7. Margulis Lynn. Evolution Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Accad. Sci.* Feb 1996, Vol. 93, pp. 1071-1076.
8. Witter LL.D Thermal Injury and recovery of selected microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 1981. 64:174-177.
9. Woese CR. Whither microbiology? Phylogenetic trees. *Curr Biol*. 1996 Sep 1;6(9):1060-3.
10. Woese CR. "Evolving biological organization". Jan Sapp (ed.). *Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies*: Oxford University Press. pp. 99–117. 2005
11. Zwietering M y Asselt E. A systematic approach to determinate global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food*, 2006. 107:73-82.

Cybergrafía (figuras)

1. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis235.pdf>
2. <http://myplace.frontier.com/~dffix/medmicro/genmicr.htm>

5.7. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES

Para comprender la estructura y función de los tejidos de la planta, hay que entender primero la estructura y la función de las células que las componen. Mucho de lo que sabemos acerca de las células se ha aprendido usando técnicas bioquímicas y microscopía electrónica.

La célula vegetal típica presenta, por fuera de la membrana plasmática, la pared celular, compuesta fundamentalmente por celulosa y secretada por el protoplasto. Con el paso del tiempo esta pared puede sufrir una serie de cambios producto del metabolismo y el envejecimiento, manifestándose con deposiciones de diversas sustancias tales como lignina, grasas (suberina, cutina, ceras), taninos, etc., que pueden ser reconocidas mediante pruebas químicas. La pared celular delimita a la célula vegetal, determina su forma y confina al protoplasma, en el cual se distribuye una serie de orgánulos bien definidos morfológicamente y limitados por membranas especiales que cumplen funciones vitales específicas. Otra característica típica de la célula vegetal es la presencia de plastidios, los cuales pueden ser pigmentados (cloroplastos y cromoplastos) o no pigmentados (leucoplastos). La clorofila es el pigmento fundamental de los cloroplastos, mientras que los carotenos dan la coloración rojiza o anaranjada de los cromoplastos; dentro de los plastidios no pigmentados se encuentran los elaioplastos, que almacenan grasas (lípidos) y los amiloplastos, que almacenan almidón.

Este laboratorio se centra en los aspectos de la estructura de células vegetales que se pueden observar con microscopio de luz. Después de completar esta práctica de laboratorio el estudiante debe tener una mejor comprensión de la naturaleza dinámica de las células vegetales.

Objetivos

- Reconocer y Diferenciar estructuras y organelos específicos de las células vegetales.
- Distinguir algunos orgánulos y estructuras características de una célula vegetal, que pueden ser observados con el microscopio óptico.

Materiales y reactivos

- Microscopio
- Porta y cubreobjetos
- Flor de Tradescantia, Astromelia o Agapanto
- Hojas de elodea o epidermis de cebolla
- Peciolos de Begonia
- Placas preparadas de los amiloplastos de grano de avena y grano de trigo
- Pétalos de geranio
- Pulpa de pera
- Hojas de pino preparadas
- Negro amido 1%
- Ácido acético 7%
- Compás*
- Lápiz*
- Gotero*
- Tijeras*
- Pinzas (depilador)*
- Cuchillas de afeitarse nuevas*
- Un bulbo de cebolla pequeño*
- Tela ojo de pescado o papel*
- Cajas de Petri
- Floroglucina (solución saturada en 20% de HCl)
- Lugol (Yoduro de potasio 2% + 0.2% de Yodo en agua)
- Frasco lavador con agua
- Toallas de papel*.

- Limpialentes
- Marcador de vidrio*
- Jabón antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

Procedimiento para realizar secciones de material vegetal

1. Siéntese cómodamente con los antebrazos apoyados y los codos pegados al cuerpo. Sujete el tejido que va a cortar entre el dedo pulgar y el índice.
2. La hoja de afeitar, El tejido y los dedos deben estar húmedos, el agua debe gotear los dedos al cortar.
3. Cortar el tejido de forma rápida y sin problemas en el plano deseado orientando la hoja de afeitar hacia usted en un movimiento de corte suave, la hoja de afeitar debe descansar en la punta del dedo pulgar. Utilice el pulgar para controlar el grosor y la uniformidad de las secciones. esto toma práctica, concéntrese en conseguir porciones muy finas de algunas secciones. No es necesario obtener secciones transversales completas.
4. Traslade las secciones en una caja de petri llena de agua, siempre utilice pinzas
5. Traslade las secciones a una placa de tinción de acuerdo con lo indicado.
6. Posteriormente enjuague en una caja petri que contiene agua.
7. Monte las secciones sobre el portaobjetos limpio con una gota de agua. Para colocar el cubreobjetos, manténgalo en un ángulo de 45° tocando la gota de agua con un borde. Baje el cubreobjetos lentamente para evitar las burbujas de aire.
8. Se pueden realizar montajes semipermanentes mediante la fijación del tejido en glutaraldehído con buffer fosfato, luego se pasa a glicerol y se sella el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente.

Parte 1. Células vegetales en movimiento

1. Tomar un estambre de una flor de Tradescantia, Astromelia o Agapanto (hojas de elodea o epidermis de cebolla se puede utilizar si las flores no están disponibles). Observe los finos pelos blancos en el filamento. Retire la antera y haga una preparación en fresco del filamento. Examine los pelos estaminales utilizando el microscopio compuesto.
2. Cada estambre se compone de un grupo células. Enfoque cuidadosamente en una sola célula y observe el núcleo grande. Si usted observa el citoplasma con cuidado debería ver pequeñas partículas que se mueven en un proceso llamado corriente citoplasmática. La corriente citoplasmática es impulsada por las mismas proteínas que son responsables del movimiento muscular, la actina y la miosina. Las partículas que se mueven se recubren con la miosina, que los mueve a lo largo de los cables de actina utilizando la energía derivada a partir de ATP. Intente recorrer el movimiento que se produce en las células vegetales vivas.
3. Dibuje una célula de pelo de estambre y etiquete el núcleo, citoplasma y la vacuola

Parte 2. Plastidios

Los plastidios se derivan de proplastidios, que son orgánulos autorreplicantes que se encuentran en el tejido meristemático. El plastidio más común es el **cloroplasto** que contiene los pigmentos fotosintéticos como la clorofila. Otros tipos de plástidos incluyen **cromoplastos** que contienen pigmentos carotenoides rojo, naranja o amarillo y los **amiloplastos** que almacenan grandes cantidades de almidón. Las células de las hojas de plantas que han germinado en la oscuridad contienen **etioplastos**, que se desarrollan en cloroplastos tan pronto como las hojas son expuestas a la luz.

1. **Cloroplastos:** Hacer una preparación en fresco de hojas de elodea, examinar con el microscopio compuesto. Los cuerpos verdes, en forma de disco son los cloroplastos.
2. **Amiloplastos:** Los embriones a menudo contienen grandes cantidades de almidón almacenado. ¿Por qué? Examinar las placas preparadas de los amiloplastos de grano de avena y grano de trigo e identificar los granos de almidón. Cada amiloplasto contiene varios granos de almidón, pero los límites de los orgánulos no suelen ser visibles con el microscopio de luz.

Dibuje comparativamente los cloroplastos de elodea y amiloplastos del embrión de trigo o maíz.

3. **Cromoplastos:** Hacer preparaciones húmedas de cromoplastos en pétalo de geranio. **Compare, dibuje y etiquete células que contienen cloroplastos y cromoplastos en el pimiento verde y rojo respectivamente.**

Parte 3. Vacuolas

1. **Pigmentos vacuolares:** En contraste con cromoplastos, las vacuolas contienen pigmentos de antocianina, que son hidrófilos (soluble en agua). Pelar un trozo de epidermis de un bulbo de la cebolla roja o una hoja de Tradescantia y realizar una preparación en fresco. Los pigmentos rojo-violeta que observa están contenidos dentro de la vacuola. Además de contener pigmentos y otros materiales, las vacuolas funcionan de manera similar a los lisosomas de las células animales.
2. **Taninos:** Las vacuolas de algunas células acumulan sustancias fenólicas llamadas taninos. Estos compuestos son complejos con proteínas que ayudan a proteger las plantas contra insectos y patógenos. Realice un montaje con un corte transversal de hoja de pino ya tratada con el colorante (Negro amido a 1% en ácido acético al 7% 1 minuto, transferir a ácido acético al 7% y después lavar con agua). Examine la preparación de hojas de pino, identifique la tinción roja en células que contienen vacuolas con tanino. **Dibuje y rotule comparativamente células con vacuolas pigmentadas (Tradescantia) y vacuolas que contienen taninos (hoja de pino).**
3. **Cristales:** Algunas células acumulan oxalato de calcio cristalino en sus vacuolas. Los cristales de oxalato de calcio inhiben la depredación y pueden servir de depósito o de almacenamiento de calcio. Los materiales cristalinos se pueden observar mejor con luz polarizada. Observe placas preparadas de epidermis de cebolla vieja y peciolo de begonia. Los cristales o rafidios son aciculares. Los cristales drusos pueden ser identificados en las secciones del peciolo de Begonia. Examine cortes transversales de hojas, peciolo y tallos de las especies mencionadas observe e identifique los cristales que se acumulan en vacuolas. **Dibuje y rotule en forma comparativa células con cristales rafidios (hoja de cebra o balazo) y cristales drusa (begonia).**

Parte 4. Paredes celulares

Células de las plantas en crecimiento producen las paredes celulares primarias compuestas principalmente de polisacáridos. Algunos tipos de células producen una pared celular secundaria que puede llegar a ser impregnada con un aromático polímero llamado lignina. Las células con paredes celulares primarias y las que tienen paredes celulares secundarias lignificadas se pueden observar en la pulpa de la pera. Obtener un pequeño trozo de la pera y colocarlo en un portaobjetos con una gota de floroglucina (Precaución: el floroglucina se disolvió en HCl 20%). Coloque un cubreobjetos sobre el material y presione suavemente para extender las células. Examine el portaobjetos con el microscopio compuesto. El floroglucina reacciona con la lignina para producir un color rojo, sólo se tiñen las células con paredes celulares secundarias. Las células que aparecen sin teñir sólo tienen paredes primarias.

Dibuje un diagrama que distinga a las células con paredes celulares primarias de las que tienen paredes celulares secundarias.



Cuestionario

Con base en sus observaciones y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica relacionando estructuras celulares y su función:

1. ¿Cuál es la importancia del movimiento celular especialmente el movimiento de cloroplastos?
2. ¿Cuál es la función de diferentes pigmentos en cloroplastos y cromoplastos?
3. ¿Porque algunos compuestos se acumulan en la vacuola celular?
4. Realice una breve consulta sobre la estructura y la función de la pared celular.

Bibliografía

1. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
2. Roberts A. 2012. Plant structure and development. Lab Manual. Department of Biological Sciences. University of Rhode Island. 45 pp.
3. Salisbury F.C. y Ross C. 2000. Fisiología de las plantas 1. Células: agua soluciones y superficies. Paraninfo Thomson Learning. Madrid. Capítulo 1 3-36 p.

5.8. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Dentro de la extraordinaria complejidad que presenta la estructura y funcionalidad en los animales nos encontraremos con elevados niveles de especialización que revertirán en una gran diversidad celular y por lo tanto de tejidos. Sin embargo, todas las células animales presentan una característica común: la ausencia de la pared celular; carecen por ello de la rigidez típica de la célula vegetal. De manera general podemos clasificar cinco tipos de tejidos animales: epitelial, sanguíneo, muscular, nervioso, sostén.

El tejido conjuntivo a diferencia del epitelial, está formado por células de diferente tipo (fibroblastos, adipocitos, macrófagos, fibras de colágeno, etc.) inmersas en una abundante matriz en donde predominan los compuestos sulfatados como el condroitin sulfato.

Forman parte de huesos, cartílagos, tendones, ligamentos, de las cubiertas de la mayor parte de los órganos internos y de la sangre. La sangre humana está compuesta de plasma (55%) y elementos celulares (45%). El plasma está constituido por agua, iones, proteínas plasmáticas y sustancias transportadas por la sangre, y los elementos celulares son los eritrocitos, leucocitos y las plaquetas.

- **Eritrocitos** (glóbulos rojos): su principal función es transportar oxígeno y dióxido de carbono, en mamíferos son anucleados. La hemoglobina (Hb) es una proteína importante en los glóbulos rojos que lleva oxígeno desde los pulmones a todas las partes del cuerpo.
- **Leucocitos** (glóbulos blancos): constituyen la principal defensa del organismo y asisten en el proceso inmunológico, ayudan a curar las heridas no solamente combatiendo la infección, sino también ingiriendo células muertas, restos de tejido y glóbulos rojos viejos. Nos protegen de los cuerpos extraños que entran en la corriente sanguínea, como los alérgenos.

Se dividen en dos grandes grupos: Granulocitos y agranulocitos:

1. **Granulocitos** con núcleo multilobulado o segmentado e incluyen:

Neutrófilos: principal sistema de defensa del organismo que participan en la destrucción de agentes infecciosos, mediante la producción de toxinas y/o fagocitosis. Aproximadamente son el 70 % de los leucocitos.

Basófilos: secretan sustancias como la heparina con propiedades anticoagulantes y la histamina que estimula el proceso de inflamación.

Eusinófilos: se activan y aumenta su número en infecciones y alergias.

2. **Agranulocitos:** Núcleo redondo u oval no segmentado. Son mononucleares. Los dos están asociados con el sistema inmunológico. Son producidos en el tejido linfóide del bazo, el timo y los ganglios linfáticos.

Monocitos: Núcleo de mayor tamaño, en forma de herradura, de riñón o de frijol, son los leucocitos más grandes, y aumentan en caso de infección, emigrando a los tejidos donde se convierten en macrófagos, se acumulan en pulmones, hígado, bazo, médula ósea, donde sobreviven muchos meses. Digieren sustancias extrañas no bacterianas durante las infecciones crónicas, además de células muertas o dañadas.

Linfocitos: Son células destructoras, principalmente cuando ocurren infecciones agudas. Producen importantes anticuerpos, son importantes en la inmunidad celular, se diferencian de dos tipos "T" y "B". Su núcleo es redondo u oval con una pequeña escotadura en la parte superior.

Plaquetas (trombocitos): su función principal es la coagulación de la sangre. Las plaquetas tienen un tamaño mucho más pequeño que el resto de las células sanguíneas. Se aglutinan en el orificio de un vaso sanguíneo formando un coágulo, o trombo, que detiene la hemorragia.

La producción de linfocitos se puede realizar en diversas partes (mencionado arriba). Pero la producción de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos se realiza exclusivamente en la médula ósea. También podemos encontrar otro tipo de leucocitos como las células plasmáticas y los macrófagos en la médula ósea y en otros sitios (Figura 19).

Neutrófilos (60-70 %): tienen un diámetro de 12 a 15 μm y un núcleo dividido en 3 o 5 lóbulos

Linfocitos (25- 30%): tienen un diámetro de 5 a 8 μm y el núcleo ocupa la mayor parte de la célula.

Monocitos (5-10%): tienen un diámetro de 12 a 18 μm y el núcleo tiene forma arriñonada y abundante citoplasma.

Eusinófilos (1-4%): tienen un diámetro de 12 a 15 μm y un núcleo con dos lóbulos unidos por cromatina
Basófilos (0.5 %): tienen un diámetro de 12 a 15 μm y un núcleo bilobulado en forma de "S" (Figura 19).

Objetivos

- Aprender cómo se hacen preparaciones en fresco, semi-fijas de frotis sanguíneos.
- Conocer y aplicar la técnica de tinción más utilizada para la diferenciación del tejido sanguíneo
- Reconocer características para identificar células sanguíneas.

Materiales y reactivos

- Microscopio
- Mechero
- Lancetas
- Colorante de Wright
- Muestras biológicas sanguíneas de ave y perro conseguidas en la clínica veterinaria
- Muestra de sangre de ser humano
- Solución buffer pH 6.0
- Agua destilada
- Láminas y laminillas
- Palillos de dientes*
- Lanceta estéril
- Guantes quirúrgicos desechables*
- Papel toalla*
- Marcador de vidrio
- Jabón antibacterial para limpieza de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

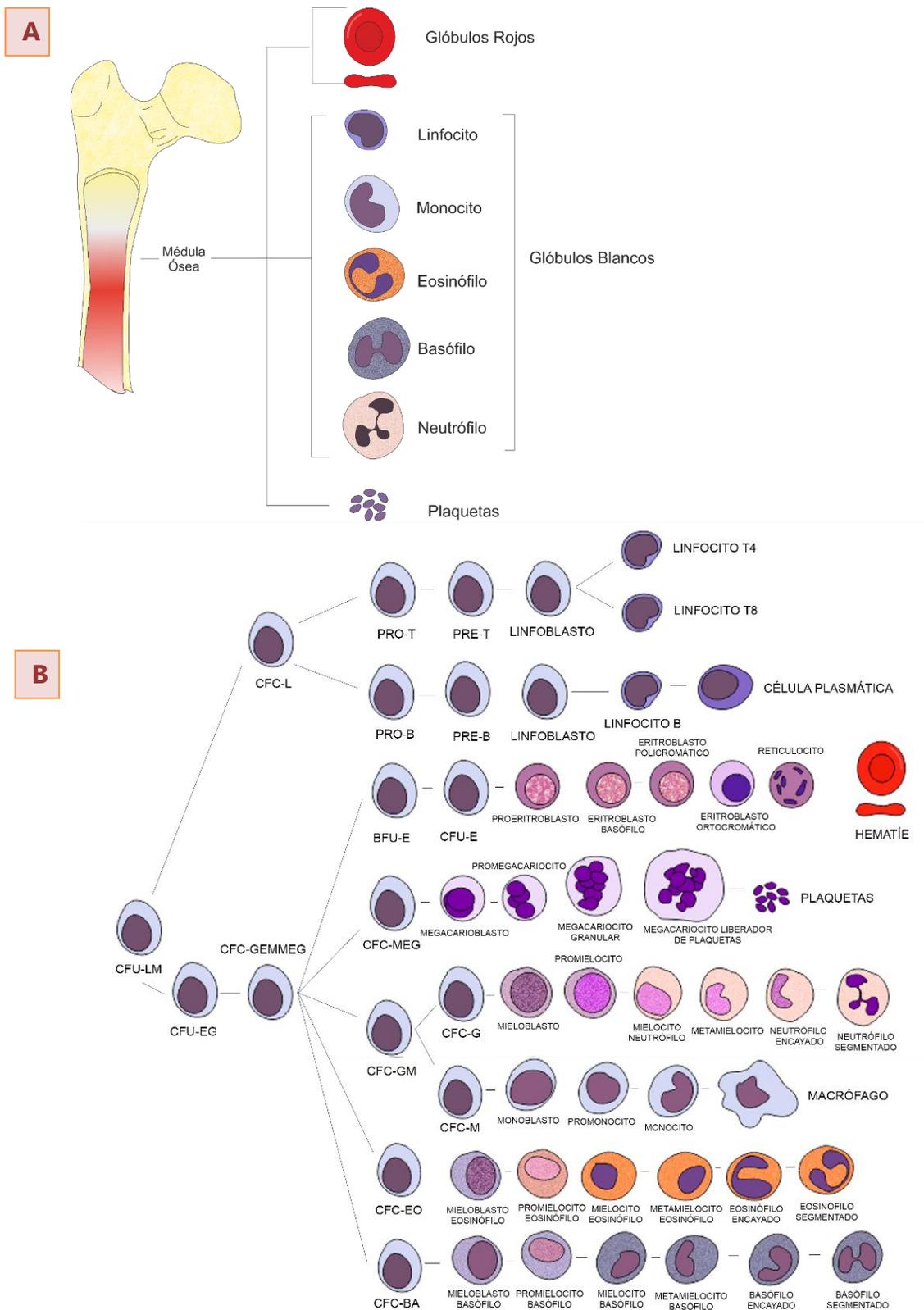


Figura 19. A. Hematopoyesis. B. Diferenciación de células sanguíneas. Fuente: Los autores.

Procedimiento

Observación de células sanguíneas

1. Con una lanceta estéril pínchese el dedo pulgar para extraer una gota de sangre. Colóquela en el extremo de un portaobjetos, haga un extendido y deje secar al aire.
2. Coloque igualmente una gota de sangre de perro y de ave en un portaobjetos, realice el mismo procedimiento del punto anterior.
3. Agregue colorante de Wright cubriendo el extendido durante cinco minutos. Elimine el exceso de colorante, agregue solución buffer pH 6.0 y deje por tres minutos. Lave la placa y observe en mayor aumento. Dibuje los diferentes tipos de glóbulos blancos y demás células sanguíneas en los tres tipos de muestras observadas.
4. Realice los dibujos 40X de las diferentes muestras observadas, señalando las células que los conforman y los componentes celulares que alcance a diferenciar.



Cuestionario

1. Revise cada una de las laminillas, identifique las diferencias de forma y tamaño relativo entre las células sanguíneas de los diferentes taxa.
2. Enumere los diferentes tipos de células sanguíneas encontradas. (Identificar eritrocitos y leucocitos).
3. Identifique los diferentes tipos de leucocitos de acuerdo a la forma y tamaño del núcleo.
4. Elabore cuadro sinóptico con las características de las células sanguíneas de los taxa observados.
5. ¿Para qué sirve un recuento leucocitario?
6. ¿Bajo qué patologías se incrementan las diferentes líneas celulares granulocíticas y agranulocíticas en el humano?
7. Teniendo en cuenta **las observaciones del laboratorio** complete el siguiente cuadro comparativo:

Características	Células procarióticas	Células vegetales	Células animales
Tamaño			
Forma			
Estructuras celulares Observadas			

Bibliografía

1. Lechuga Granados, Adriana., Tafolla Venegas, David., García Garrido, Pedro., Cancino Murillo, Ramón., Soria Baltazar, Román., Manzo Avalos, Salvador. 2011. Manual de Prácticas de Laboratorio de Fisiología Animal. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología.
2. <http://www.uchicagokidshospital.org/online-library/content=S05425>.
3. http://www.tafadycursos.com/load/cuerpo_humano/aparatos/aparato_cardiovascular_sangre/29-1-0-1099.

5.9 ACTIVIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

La célula, para llevar a cabo sus funciones vitales, requiere de un intercambio constante de materia y energía con su entorno. Para esto, las moléculas, requieren atravesar la membrana que la recubre. La membrana plasmática, por el tipo de moléculas que la componen, es de naturaleza no polar. Las moléculas no polares tendrán libre paso a través de ella, dependiendo de su grado de solubilidad en lípidos y de su tamaño; a mayor liposolubilidad, la penetración es más rápida.

Una molécula debe satisfacer dos condiciones para difundir al interior de una célula a través de la membrana plasmática: Debe estar presente en concentración más elevada fuera de la célula, y la membrana debe ser permeable a ella. Una membrana puede ser permeable a un soluto determinado porque pasa directamente a través de la bicapa de lípidos, o porque es capaz de atravesar un poro situado en el espesor de la membrana que impide el contacto del soluto con las moléculas lipídicas de la bicapa. Otro factor que determina la velocidad de penetración de un compuesto a través de una membrana es su tamaño. Las moléculas de menor tamaño tienden a penetrar en la bicapa de lípidos de una membrana con mayor rapidez en comparación con la molécula más grande. Las moléculas de agua se desplazan con mucha mayor rapidez a través de una membrana celular que los iones y pequeños solutos polares comúnmente presentes en las células. Debido a esta diferencia de penetrabilidad del agua en comparación con solutos se dice que las membranas son semipermeables.

El agua se mueve rápidamente a través de una membrana semipermeable desde una región de baja concentración hasta otra de alta concentración de soluto. Este proceso se denomina ósmosis y puede demostrarse fácilmente colocando la célula en una solución con una concentración de soluto diferente de la presente en el interior de ella. Cuando se colocan las células en una solución con una concentración salina similar a la de su medio (isotónica), la concentración de agua permanece constante dentro y fuera de la célula, por lo que su volumen y forma no se alteran. Los eritrocitos humanos pueden conservarse por largos periodos en una solución de cloruro de sodio al 0.9% sin presentar alteración ni hemólisis. Cuando las células son colocadas en soluciones de menor concentración de soluto que la propia (hipotónicas), el agua tiende a pasar hacia donde está la mayor concentración, dando lugar a que las células se hinchen. Por otra parte, cuando se colocan en soluciones de mayor concentración de soluto que la de ellas (hipertónicas), el agua tiende a salir ocasionando la contracción celular.

En las células vegetales, la presencia de una pared celular rígida les ayuda a evitar un incremento excesivo de volumen ante soluciones hipotónicas, sin embargo, en soluciones hipertónicas, sí se puede apreciar la contracción del citoplasma por la pérdida de agua.

Objetivos

- Observar el comportamiento de las células vegetales y animales frente a soluciones con diferente concentración de soluto.
- En la segunda parte de la práctica se observará el fenómeno de la permeabilidad en una membrana artificial.

Materiales y reactivos

- 1 vaso de precipitado de 500 ml
- 1 vaso de precipitado de 2 litros
- Microscopio de campo claro
- 1 vidrio de reloj
- Papel seda *
- Lanceta

- 3 pipetas Pasteur
- Soluciones de NaCl 0.15 M (0.9%), 0.035 M y 0.6 M
- Fenolftaleína
- Lugol
- Solución de almidón con hidróxido de Amonio
- Frasco con etanol
- Papel celofán dulce *
- Marcador de vidrio*
- Hilo*
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Elodea*
- Algodón *
- Regla graduada en cm *
- Parrilla de calentamiento
- Varilla de vidrio
- Tijeras *
- 3 huevos de gallina*
- Vinagre de cocina*
- Solución de almidón
- Tinta*
- 2 tubos de ensayo
- Papel toalla*
- Jabón antibacterial para lavado de manos.

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

NOTAS:

1. Tenga cuidado de utilizar la pipeta correspondiente para cada solución y de no confundirlas, de hacerlo, se alterará la concentración de las soluciones.
2. Etiquete debidamente los portaobjetos para evitar confusiones en sus observaciones y resultados.
3. Evite la desecación de sus preparaciones.

Procedimiento

Estudio microscópico

1. Con una lanceta estéril pique la yema de cualquiera de sus dedos y deposite una gota de sangre en un vidrio de reloj perfectamente limpio y etiquetado que contenga 2 ml de la solución de NaCl 0.15 M (0.9%), deje reposar un minuto. Con ayuda de una pipeta Pasteur coloque una gota de esta suspensión celular en un portaobjetos, después coloque el cubreobjetos y observe. Enfoque con el objetivo de 10X y pase al objetivo de 40X para hacer sus observaciones (Figura 20).

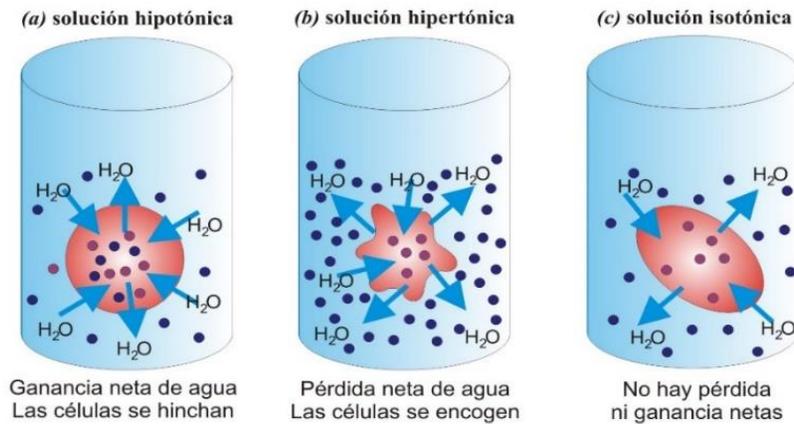


Figura 20. Efectos de la diferencia de concentración de solutos en lados opuestos de la membrana plasmática. (a) Una célula colocada en solución hipotónica (con menor concentración de soluto que la célula) se hincha debido a ganancia neta de agua por osmosis. (b) Una célula en solución hipertónica se encoge debido a pérdida neta de agua por ósmosis. (c) Una célula colocada en solución isotónica mantiene un volumen constante debido a que el flujo de agua por osmosis es igual al interior que el exterior. Fuente: Los autores.

2. Repetir el mismo procedimiento con la solución de NaCl 0.035 M, y con la de 0.6 M.
3. En un vidrio de reloj que contenga 2 ml de la solución de cloruro de sodio 0.15 M, deposite una hoja de elodea, déjela reposar de 2 a 3 min. Coloque la hoja en un portaobjetos, cúbrala con el cubreobjetos y observe al microscopio a 10X y 40X. Ponga atención en el movimiento de los cloroplastos.
4. Repita el paso anterior con las otras dos concentraciones (Figura 21).

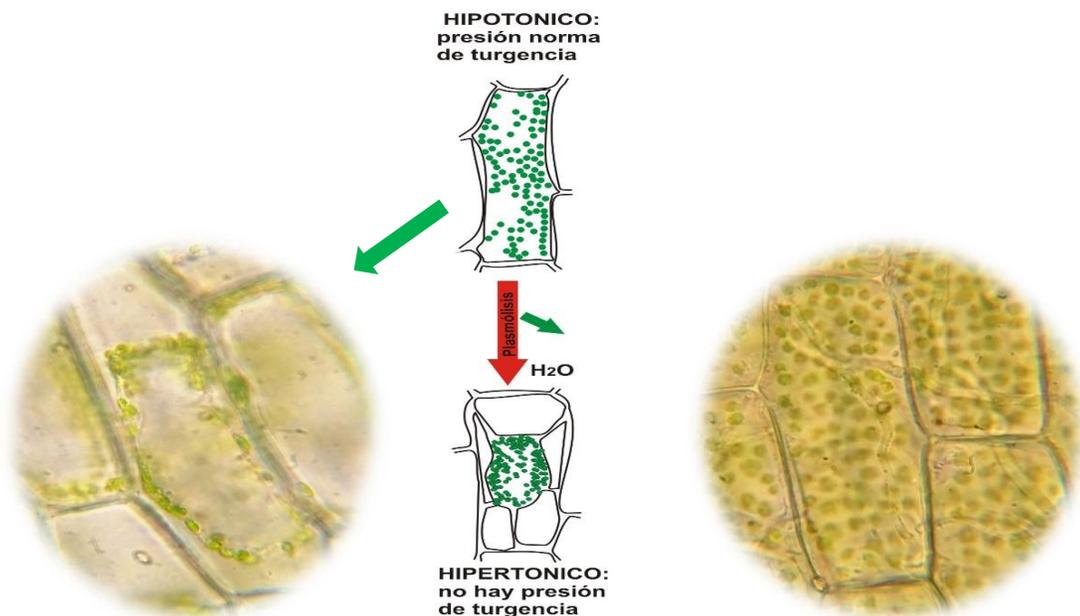


Figura 21. Efecto de la ósmosis sobre una célula vegetal. (a) Las plantas acuáticas que viven en agua dulce están rodeadas por un medio hipotónico. Por lo tanto, el agua tiende a fluir al interior de las células generando presión por turgencia. (b) Si la planta se coloca en solución hipertónica, como agua de mar, la célula pierde agua y la membrana plasmática se separa de la pared celular. Fuente: Los autores.

Estudio macroscópico con una membrana artificial

1. Por sección: En un vaso de precipitado coloque 2 litros agua de la llave, ponga en él un cuadro de papel celofán de 20 x 20 cm por equipo y hiérvalo por 15 minutos (Figura 22).



Figura 22. Vaso de precipitados conteniendo los cuadros de papel celofán.
Fuente: Los autores.

2. Sáquelo y déjelo enfriar.
3. Una todas las orillas del papel celofán y coloque en su interior 15 mL de la solución de almidón con hidróxido de amonio y amárrelo con hilo de tal manera que la bolsa que se forma quede perfectamente cerrada (Figura 23).



Figura 23. Bolsa de celofán que contiene la solución de almidón con hidróxido de amonio. Fuente: Los autores.

4. Enjuague la bolsa con agua de la llave.
5. Agite la bolsa dentro de un vaso de precipitado de 500 mL que contenga agua de la llave y 5 gotas de fenolftaleína durante 5 minutos. Observe si cambia el color del agua.
6. Abra la bolsa y agregue 4 gotas de la solución de lugol, observe si aparece color.
7. Agregue 4 gotas de lugol al agua del vaso de precipitado y compare con la coloración observada en el punto anterior.

Estudio macroscópico con una membrana-huevo

1. Para este experimento, es necesario que se quite el contenido de un huevo de gallina, usando solamente un pequeño orificio en su parte superior, una vez extraído su contenido, se vierte en su interior 15 mL de la solución de almidón con hidróxido de amonio.
2. Coloque el huevo sumergido hasta la parte media en un vaso de precipitado que contenga agua de la llave y 5 gotas de fenolftaleína durante 5 minutos, inicialmente. Observe si cambia el color del agua hasta un tiempo máximo de dos horas.
3. Agregue en el interior del huevo 4 gotas de la solución de lugol, observe si aparece color.

Estudio macroscópico con una membrana artificial-huevo de gallina

1. Para este experimento, es necesario que se quite el contenido de un huevo de gallina, usando solamente un pequeño orificio en su parte superior, una vez extraído su contenido, se vierte en su interior solución de lugol (aproximadamente 5 mL) (Figura 24).

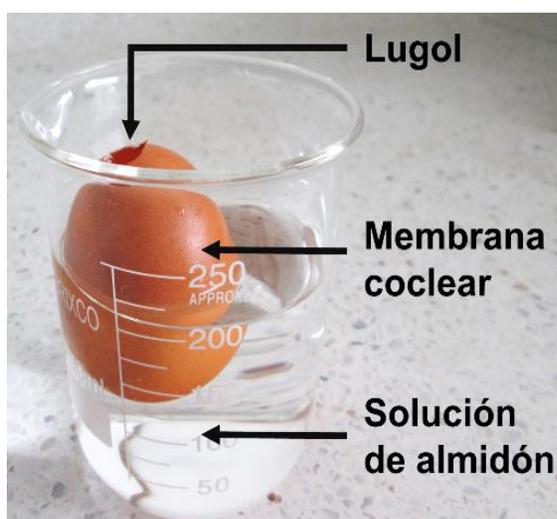


Figura 24. Difusión del yodo a través de la membrana coclear de un huevo de gallina. Fuente: Los autores.

2. El huevo con la solución se coloca superficialmente en un recipiente que contiene solución de almidón y se deja en contacto con la membrana coclear (tener cuidado que no entre solución de almidón a través del orificio de la parte superior). Observe si cambia la solución de color.
3. Explique lo sucedido en el experimento.

Experimento complementario de osmosis-huevo saltarín

1. Seleccionar un huevo fresco de gallina, preferencialmente que no sea blanco. Anote y documente las características morfológicas, como textura, tamaño, forma, color, etc.
2. 48 horas antes de la práctica, coloque en un frasco o un vaso de precipitados, vinagre de cocina, de tal forma que el volumen cubra el huevo de gallina. Deje a temperatura ambiente hasta el día de la práctica (Figura 25).
3. Después de las 48 horas de exposición, sacar el huevo, enjuagarlo con agua de grifo y posteriormente verificar sus características.
4. Anote lo observado y explique sus hipótesis sobre lo ocurrido en este experimento.

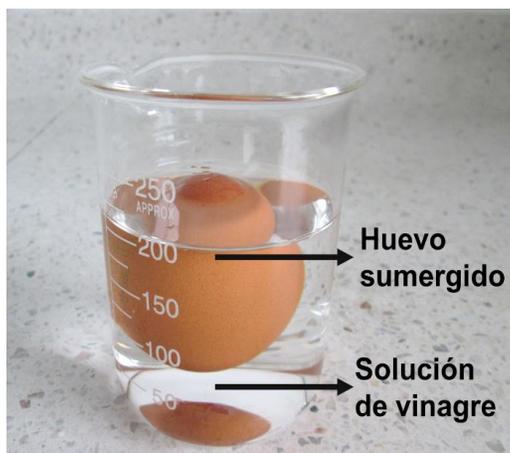


Figura 25. Montaje del experimento del huevo saltarín para explicar la osmosis. Fuente: Los autores.

Estudio macroscópico de difusión-Agua diferentes temperaturas

1. Para realizar nuestro experimento necesitamos un tubo de ensayo con agua fría, otro con agua caliente y tinta.
2. Dejar caer una gota de tinta en el recipiente con agua fría, observar que la tinta se difunde lentamente. A la vez, dejar caer una gota de tinta en el recipiente con agua caliente, observar que la tinta se mezcla con el agua con mayor rapidez. ¿Por qué sucede esto?
Al dejar caer una gota de tinta en un recipiente con agua, se observa que la tinta se difunde por el agua al cabo de un tiempo. Este fenómeno se debe al movimiento aleatorio de las moléculas de agua y se denomina difusión.
La teoría cinética considera que las moléculas de agua poseen un movimiento aleatorio que aumenta con la temperatura. Por tanto, en el recipiente con agua caliente las moléculas de agua se mueven con mayor velocidad que en el recipiente con agua fría.
Si las moléculas se mueven con mayor velocidad aumentan los choques con las partículas que forman la tinta y se produce la difusión con mayor rapidez.
3. Explique qué sucedería si el agua se encuentra a 37°C.



Cuestionario

1. Esquematice el comportamiento de las células vegetales y animales frente a las concentraciones de NaCl.
2. Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:
3. Diga qué propósito tiene colocar las células en una solución isotónica.
4. ¿Qué diferencias observó entre las células animales y vegetales en presencia de la solución hipotónica? Explique la causa.
5. ¿Qué efecto observó en las células al colocarlas en una solución hipertónica?
6. De las sustancias utilizadas (almidón, hidróxido de amonio y fenoltaleína), diga cuál(es) atravesaron la membrana de celofán y cómo se demostró esto. Diga cuáles no atravesaron y a qué se debe.
7. Si los resultados obtenidos en su práctica no fueron los esperados, explique a qué pudo deberse.
8. ¿Por qué se dice que la membrana tiene permeabilidad selectiva?
9. ¿Por qué se dice que la bicapa de la membrana constituye una barrera natural?
10. ¿Cuáles con los factores que afectan la velocidad de difusión a través de la membrana celular?

11. ¿Cómo está constituida la membrana celular de tal manera que permite la permeabilidad?

12. De acuerdo en las observaciones, llene la siguiente tabla:

Muestra	Molaridad	Tipo de solución	Observaciones
Eritrocitos	0,035 M		
	0,6 M		
	0,15 M		
Elodea	0,035 M		
	0,6 M		
	0,15 M		

Bibliografía

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España.
2. Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. *El Mundo de la Célula*. Pearson-Addison Wesley, México.
3. Ducolomb Ivone, Fierro, Reina., González, Cristina., Ortiz Rocío., Rodríguez, Ernesto. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Celular. 2012. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalaca. México.
4. Karp, Gerald et al. 2011. *Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos*. Sexta edición. Editorial MC Graw Hill.
5. Lodish, H., Beerk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana.

5.10 SEPARACION Y ESPECTRO DE ABSORCION DE PIGMENTOS VEGETALES

Aunque la mayoría de las hojas parecen verdes a nuestros ojos, varios pigmentos de diferente color están usualmente presentes en los cloroplastos de hojas verdes. Las clorofilas *a* y *b* proveen el color verde y absorben la energía de la luz necesaria para la fotosíntesis.

Estrechamente asociadas con las clorofilas en el cloroplasto hay otro grupo de pigmentos, los carotenoides; ellos son amarillos o rojos y juegan un papel importante en la disipación de la energía de la luz de la fotosíntesis. Los carotenoides también ayudan a proteger las clorofilas contra la fotooxidación.

Las clorofilas *a* y *b* son pigmentos tetrapirrólicos que contienen un Mg^{2+} central o metal quelado. Examine la Figura (26A) y note que, aunque las estructuras parecen idénticas, la clorofila *a* tiene un grupo metilo (CH_3) en la posición donde la clorofila *b* tiene un grupo aldehído ($-CHO$), el grupo metilo da a la clorofila *a* una leve afinidad por solventes no polares hidrofóbicos comparado con la clorofila *b*. Esta diferencia en afinidad permite su separación por técnicas cromatográficas. La feofitina la cuál pierde el Mg^{2+} central es otra forma de clorofila, pero tiene una mayor afinidad por solventes hidrofóbicos no polares. La feofitina juega un papel vital en el transporte de electrones, pero también se puede formar como producto del rompimiento de la clorofila inducida por ácidos, en el extracto de espinaca. El ácido oxálico que está presente en las vacuolas de espinaca induce la formación de feofitina en el extracto por lo que hay que tener precauciones para controlar el pH.

Los carotenoides usualmente tienen 40 átomos de carbono y se dividen en dos grupos, un grupo que está formado por hidrocarburo puro, los carotenos y otro grupo con átomos de oxígeno adicionales, las xantofilas (Figura 26B), los oxígenos adicionales, presentes como grupos hidroxilo al final de la molécula, hacen que las xantofilas sean más polares y permite que sean separadas de los carotenos por técnicas cromatografías.

Un espectro de absorción es un gráfico de la absorción de la luz, en este caso, de pigmentos vegetales en función de la longitud de onda de luz visible. Un espectro de acción por otro lado es un gráfico de la magnitud de una respuesta, por ejemplo, la tasa de fotosíntesis graficada en función de la longitud de onda de la luz. Los estudiantes determinarán el espectro de absorción de pigmentos, para derivar las longitudes de onda utilizadas más eficientemente por los pigmentos vegetales.

Materiales y reactivos

- Espectrofotómetro
- Mortero
- Tubo de ensayo de 50 ml con tapón
- 2 tubos de ensayo de 10 ml con tapa
- Pipeta pasteur con bomba
- Tubo capilar
- Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 ml
- Pipeteadores para solventes
- Papel de cromatografía o papel Watman No. 1 de 22 x 1.5 cm
- Acetona concentrada
- Éter de petróleo
- Solvente para la cromatografía: Acetona: éter de petróleo (10:90 por volumen)
- Hojas de espinaca*
- Papel aluminio*
- Gancho o clip*
- Tijeras*
- Lápiz*



Toallas de papel*

Jabón antibacterial para lavado de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

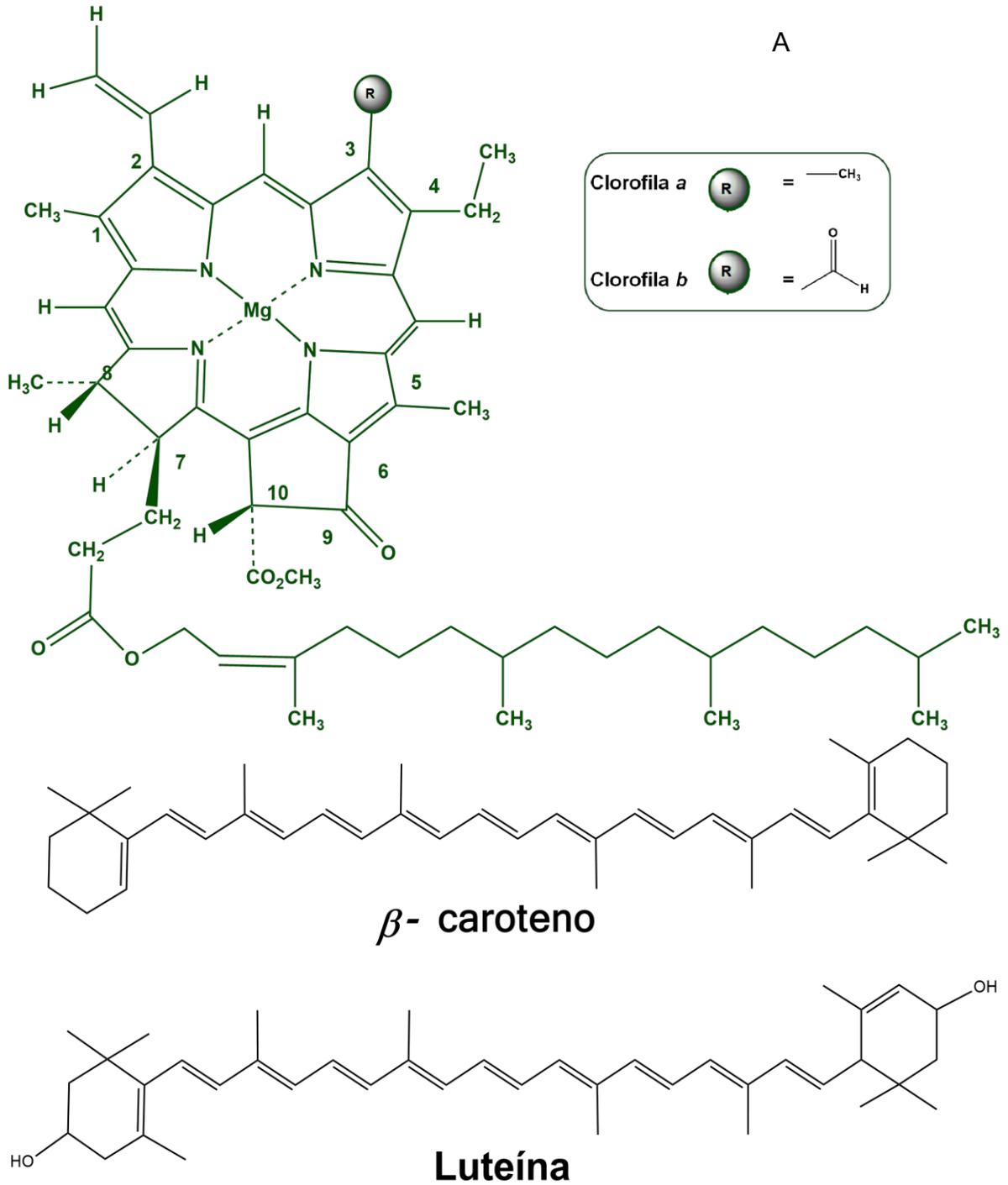


Figura 26. Estructura química de la clorofila a y b (A), y Carotenoides (B).

Fuente: Los autores.

Objetivos

Usando un extracto de pigmentos de hojas de espinaca esta práctica permitirá separar los pigmentos por cromatografía en papel, y determinar los espectros de absorción de cada uno de ellos.

Parte 1. Procedimiento para separación de pigmentos

1. Tome 1 g de espinaca fresca y córtela en pedazos pequeños. Coloque en un mortero y triture por 10 segundos.
2. Traslade el material a un tubo de ensayo de 50 ml provisto de tapón, agregue 4ml de acetona, tápelo y agítelo vigorosamente por 10 segundos.
3. Déjelo reposar por 10 minutos, añada 4 ml de agua destilada y agite.
4. Luego agregue 3 ml de éter de petróleo y agite de nuevo vigorosamente por 5 segundos.
5. Deje reposar hasta que los solventes se separen y los pigmentos hayan sido extraídos casi por completo en la capa (superior) de éter de petróleo. El tejido vegetal habrá quedado casi blanco.
6. Con una pipeta Pasteur o gotero saque la solución superior verde oscuro evite mezclar las dos capas. Esta será la muestra utilizada para correr la cromatografía
7. Tome una tira de papel de cromatografía, mida 2 centímetros desde la parte inferior y marque un pequeño punto con lápiz (no lapicero)
8. Marque un centímetro desde la parte inferior del tubo donde se va montar la cromatografía.
9. Llene un tubo capilar colocándolo dentro del extracto de pigmentos
10. Repetidamente aplique el extracto de pigmentos sobre el punto marcado anteriormente sobre el papel de cromatografía, La muestra debe ser aplicado como una solución muy concentrada
11. Permita que la muestra sobre el papel filtro se seque
12. Desarrolle el cromatograma usando el solvente de cromatografía (acetona-éter de petróleo 10:90), el montaje debe quedar bien ensamblado y sellado
13. El papel no debe tocar las paredes de vidrio porque esto interfiere con la separación
14. Deje correr el cromatograma en la oscuridad o con luz difusa, cuando los carotenos de color naranja-amarillo casi han llegado a la parte superior del cromatograma (~ 1 cm) retírelo del tubo y marque inmediatamente la línea del frente del disolvente antes de que se seque el papel.
15. En esta mezcla de disolventes los carotenos de color amarillo anaranjado se mueven más rápido seguido por una o más bandas de xantofilas amarillas. Las clorofilas verdes (*a* y *b*) se mueven más lento.
16. Después que el cromatógrafo se ha secado y antes de proceder a la etapa de espectrofotometría (donde usted tendrá que destruir su cromatografía) asegúrese de determinar los valores de R_f para cada uno de los pigmentos separados.

Parte 2. Determinación del espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos

1. Recorte las cuatro bandas principales de pigmentos de su cromatografía. Puede combinar bandas de xantofila si hay más de una visible. La banda gris oscura que puede aparecer entre carotenos y xantofilas debe ser desechada.
2. Cada grupo debe determinar el espectro de absorción de un pigmento específico, uniendo las bandas de diferentes grupos al menos 3. Los datos obtenidos se pondrán en común para todo el grupo.
3. Resuspenda en un tubo de ensayo los trozos de las bandas de clorofila *a* y *b* en 2 ml acetona y los carotenoides en 2 ml de éter de petróleo.
4. Cubra cada tubo de ensayo con papel de aluminio y guarde en hielo hasta que se ejecute el espectro de absorción.
5. Ejecute un espectro de absorción de cada solución de pigmento usando un espectrofotómetro, inicie las lecturas a 400 nm y lea la absorbancia cada 20 nm de intervalo hasta 700 nm, Para clorofilas

a y *b* reduzca el intervalo a 10 nm entre 640 y 670. Recalibre el instrumento con cada longitud de onda usando acetona o éter de petróleo como blanco de acuerdo con el caso.

6. Registre sus datos en una tabla y realice un gráfico comparativo de los espectros de absorción (absorbancia como una función de longitud de onda) de los cuatro pigmentos principales.
7. Observe los picos de cada espectro de absorción



Cuestionario

1. ¿Qué característica usted usó para identificar los pigmentos que separó en el cromatograma? Explique
2. A partir de los espectros de absorción determine el o los picos de absorbancia para cada pigmento. Los picos de absorbancia muestran las longitudes de onda de luz que son absorbidas por el pigmento. Puede existir más de un pico para cada pigmento. Presente un cuadro que resuma el pico (s) de absorbancia para cada pigmento, la longitud de onda correspondiente (s), y el color (s) de luz que está (n) siendo mayormente absorbida.
3. ¿Por qué el extracto absorbe más energía de luz en ciertas longitudes de onda y es menor en otras?
4. Compare sus espectros de absorción con el espectro de acción de la fotosíntesis, de acuerdo a esto identifique, ¿Cuál es el pigmento primario de la fotosíntesis?

Bibliografía

1. Bravo M. Enrique. 1995. Curso de Biología Celular. Programa temático, guías de estudio y laboratorio. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
2. Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
3. Reis C. 1994. *Experiments in Plant physiology*. Prentice Hall. New Jersey.
4. Salisbury F.C. y Ross C. 2000. Fisiología de las plantas 1. Células: agua soluciones y superficies. Paraninfo Thomson Learning. Madrid. Capítulo 1 3-36 p.
5. Streit N.M., Pedrolo C.L., Weber D.C.M., Hychrecki H. L. H. 2005. The Chlorophylls. Ciencia Rural, Sana María v.35 (3) 748.755.

5.11. ACTIVIDAD DE LOS LISOSOMAS

Las sustancias que penetran en la célula por fagocitosis o pinocitosis van a experimentar la acción de las enzimas digestivas intracelulares, contenidas en orgánulos llamados lisosomas. Estos orgánulos son corpúsculos esféricos que miden aproximadamente 0.5 micrómetros, están delimitados por una unidad de membrana y contienen enzimas hidrolíticas. Se han encontrado lisosomas en todas las células animales y vegetales.

Los lisosomas promueven la digestión intracelular, tanto del material exógeno que penetra en la célula por pinocitosis, como también el material endógeno. Este último puede estar constituido por orgánulos degenerados o por productos de desasimilación del metabolismo celular.

Objetivo

- Observar la función de los lisosomas de manera análoga en ciliados.

Materiales y reactivos

- Microscopio compuesto
- Porta y cubreobjetos
- Pipetas de 1 mL
- Mechero de Bunsen
- 6 tubos de ensayo 15 x 150 mm
- Gradilla
- Pinzas
- Placas de vitrocerámica
- Trípode
- Recipiente para baño María
- Pipeta Pasteur con goma
- Termómetro
- Hoja de papel aluminio *
- Solución de Rojo Congo al 0.4%
- Cultivo de levaduras de pan (30 ml)
- Cultivo de ciliados (*Paramecium spp.*) por cada equipo
- Marcador de vidrio*
- Papel toalla*
- Jabón antibacterial para limpieza de manos*

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes.**

Procedimiento

1. En tres tubos de ensayo, coloque en cada uno de ellos un mililitro del cultivo de levaduras. Un tubo se pone en el refrigerador durante 10 minutos. Otro se coloca en el baño María a 30°C, y el último se tapa con papel aluminio y se pone en un baño María hirviendo (93°C) durante 10 minutos.
2. Al término de la exposición de cada temperatura, se coloca de inmediato en cada tubo 0.5 ml de rojo de Congo al 0.4%. Agite cada tubo y deje en reposo durante 5 minutos. Realice las observaciones al microscopio de cada uno de los tubos, poniendo atención al grado de tinción que se presenta.
3. Con base en sus observaciones seleccione el cultivo de levaduras para cumplir mejor el objetivo de su práctica. Coloque sobre un portaobjetos unas gotas del cultivo de levaduras con gotas del cultivo de ciliados. Observe al microscopio y realice un esquema inicial. Siga observando cuidadosamente

hasta visualizar de manera análoga la función de los lisosomas en ciliados (cambio de color) (Figura 27).

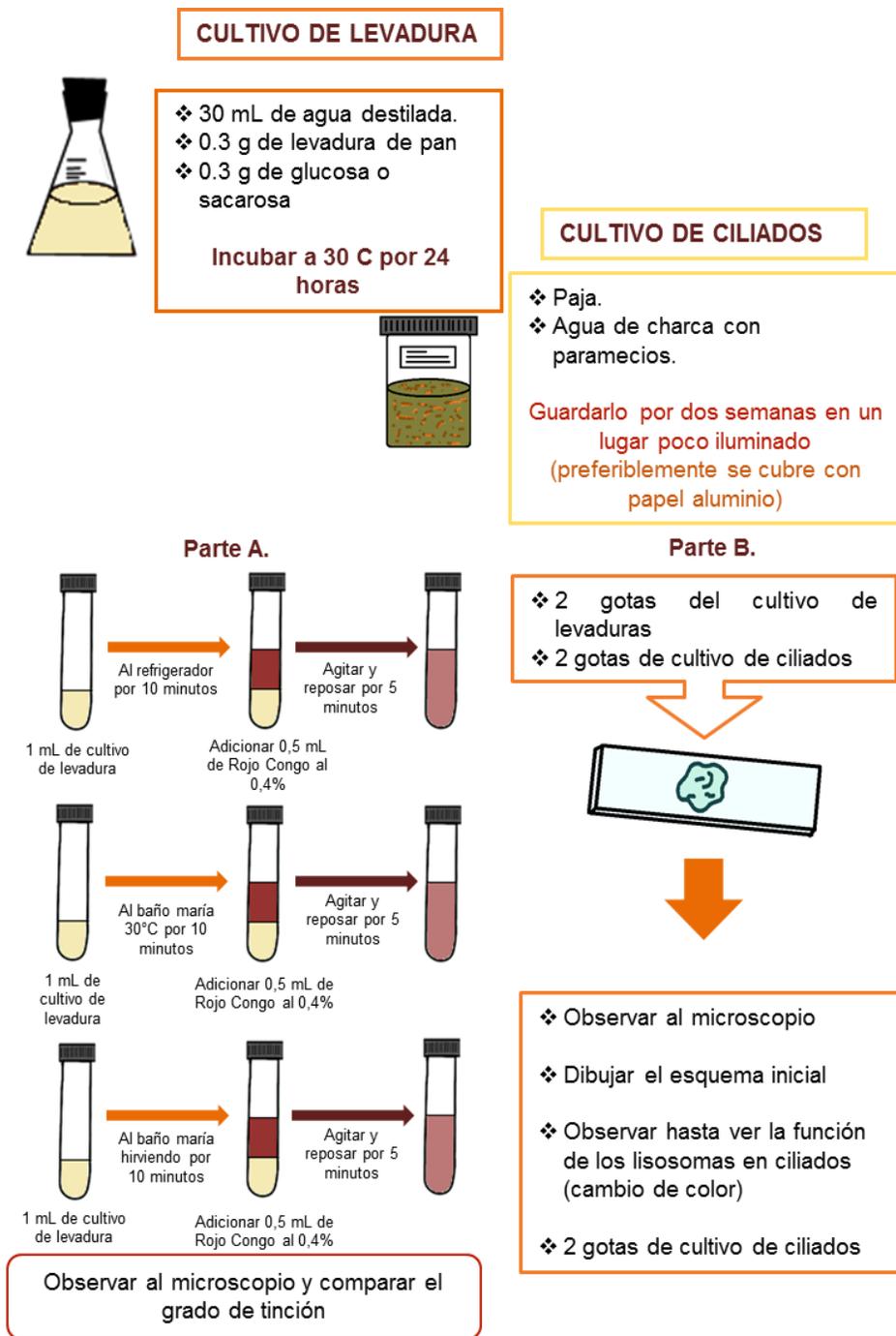


Figura 27. Esquema de trabajo para determinación de la acción lisosómica en el paramecio. Modificado por los autores de Chavez *et al.*, 2012.

**Cuestionario**

1. Presentar los siguientes esquemas:
 - Cultivo de levaduras a 0-4°C
 - Cultivo de levaduras a 30°C
 - Cultivo de levaduras en ebullición (93°C)
 - Esquema inicial del cultivo de ciliados con levaduras.
 - Esquema final del cultivo de ciliados con levaduras.
2. Tomando en cuenta tus observaciones experimentales, ¿Qué ocurre con las células de levadura dentro de los ciliados y por qué?
3. Discuta el mecanismo que ocurre al calentar las levaduras y al agregar el colorante.
4. Realice en esquemas, el origen y las funciones de los diversos tipos de lisosomas.

Bibliografía

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España.
2. Chávez, Jaime, Medina, Manuel, Sánchez, Sebastián. 2012. Manual del Laboratorio de Biología Celular y Molecular I. Facultad de Biología. Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán de Campo.

5.12. MITOSIS

La capacidad de reproducción es fundamental para la existencia, propagación y continuación de las células. Este proceso forma parte de su ciclo de vida y es denominado ciclo celular, el cual es un conjunto muy ordenado de eventos y comprende esencialmente dos periodos: interfase y división. En general, la mayor parte del tiempo del ciclo corresponde a interfase y esta se divide en tres etapas: G1, S y G2. Además, en diversos tipos celulares se ha descrito una fase "quiescente" o durmiente en la cual las células no proliferan, se le considera "fuera del ciclo" y se le conoce como G0 (G cero). La otra etapa del ciclo corresponde a la división, la cual se realiza por mitosis en todas las células somáticas y por meiosis en las células germinales.

La división celular consta de dos procesos fundamentales: la mitosis o división del núcleo y la citocinesis o división del citoplasma. Ambos procesos son independientes, pero deben ocurrir de forma sincronizada. El resultado son dos células hijas con una dotación cromosómica idéntica entre sí y a la de la célula madre.

La mitosis es el mecanismo estable que tienen las células para distribuir de forma exacta la información genética entre las células hijas durante las divisiones celulares. Durante la mitosis los cromosomas se reparten equitativamente, incluyéndose una dotación cromosómica completa en cada célula hija. Para facilitar este reparto, los cromosomas se condensan haciendo patente su morfología. Esto hace que se pueda conocer en este momento cuantos cromosomas tiene una especie, donde se localiza el centrómero (o constricción primaria), el número de brazos cromosómicos que presentan o la existencia de constricciones secundarias y satélites cromosómicos. La mitosis se divide a su vez en cuatro etapas:

Profase: Durante este periodo la fibra de cromatina, que ha ido organizándose en plegamientos cada vez más complejos, aparece como cromosomas visibles que van condensándose gradualmente. Hay $2n$ cromosomas en la célula y cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas con igual información y morfología. Éstas aparecen unidas a nivel del centrómero y a lo largo de los brazos cromosómicos gracias a complejos proteicos. Al final de la profase se desorganizan los nucléolos y la membrana nuclear se despolimeriza y sus componentes quedan dispersos en el núcleo.

Metafase: Los cromosomas se encuentran ahora libres en el citoplasma y los centrómeros de cada cromosoma contactan con las fibras del huso, que se organizan en el centro organizador de microtúbulos (MTOC), formado por los centriolos, que actúan como centro de atracción de los cromosomas hacia los polos, y la masa amorfa pericentriolar. La intervención de las fibras del huso y de otras proteínas de movimiento cromosómico permite a los cromosomas organizarse en la llamada placa metafásica. Cada cromátida hermana se orienta hacia un polo distinto lo que garantiza el reparto de la información genética de cada cromosoma a las dos células hijas. Ahora los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación y su morfología se hace patente (Figura 28). Por eso en esta fase es donde mejor se puede estudiar todas las características morfológicas de los cromosomas lo que será de utilidad para, por ejemplo, identificar homólogos y confeccionar un cariotipo o realizar estudios comparativos entre especies y conocer la evolución cariotípica ocurrida dentro de un taxón.

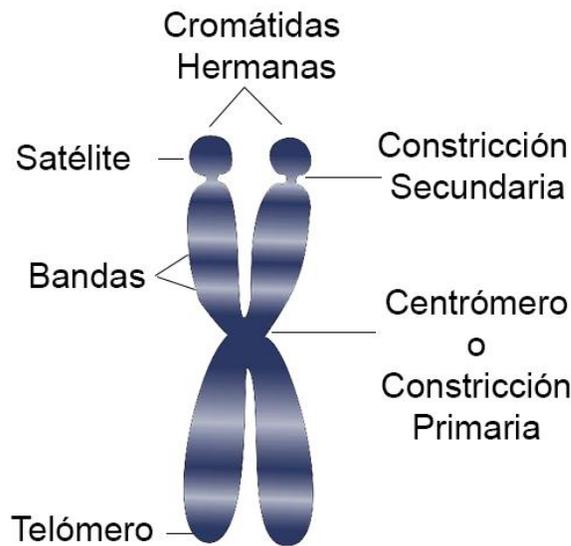


Figura 28. Morfología de los cromosomas. Fuente: Los autores.

El centrómero es la constricción primaria que aparece en todos los cromosomas y donde se asocian los cinetocoros o estructura proteica a la que se unen las fibras de huso mitótico. Su posición define el número de brazos de un cromosoma. Si está situado en un extremo del cromosoma, éste tendrá un solo brazo y si está en otra posición se observarán cromosomas con dos brazos. El cinetocoro funciona a modo de un "interfaz" entre el centrómero y las fibras del huso. En algunos cromosomas aparecen constricciones secundarias, normalmente asociadas a la región organizadora nucleolar (NOR) donde se encuentran los genes para ARN ribosómico. El fragmento de cromosoma que va desde la constricción secundaria al telómero se denomina satélite cromosómico. El telómero constituye el extremo cromosómico por lo que hay uno en cada brazo cromosómico y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del cromosoma.

Anafase: La anafase es, en general, la etapa más corta de la mitosis. Cada centrómero se divide en dos y se desorganizan las proteínas que mantenían unidas a las cromátidas hermanas, lo que les permite segregarse (migrar) a polos opuestos. En cada polo celular se observará un grupo de cromosomas ($2n$) con una sola cromátida orientados hacia el polo correspondiente.

Telofase: Los cromosomas agrupados en cada polo comienzan a descondensarse y los nucléolos y la membrana nuclear vuelven a organizarse a partir de material preexistente y de nueva síntesis. La división celular se completa al final de esta etapa con la citocinesis, donde hay también un reparto de los orgánulos y componentes citoplásmicos a las dos células hijas, aunque no se realiza de forma tan precisa como durante la mitosis. El resultado final del proceso mitótico son dos células con $2n$ cromosomas (Figura 29 B).

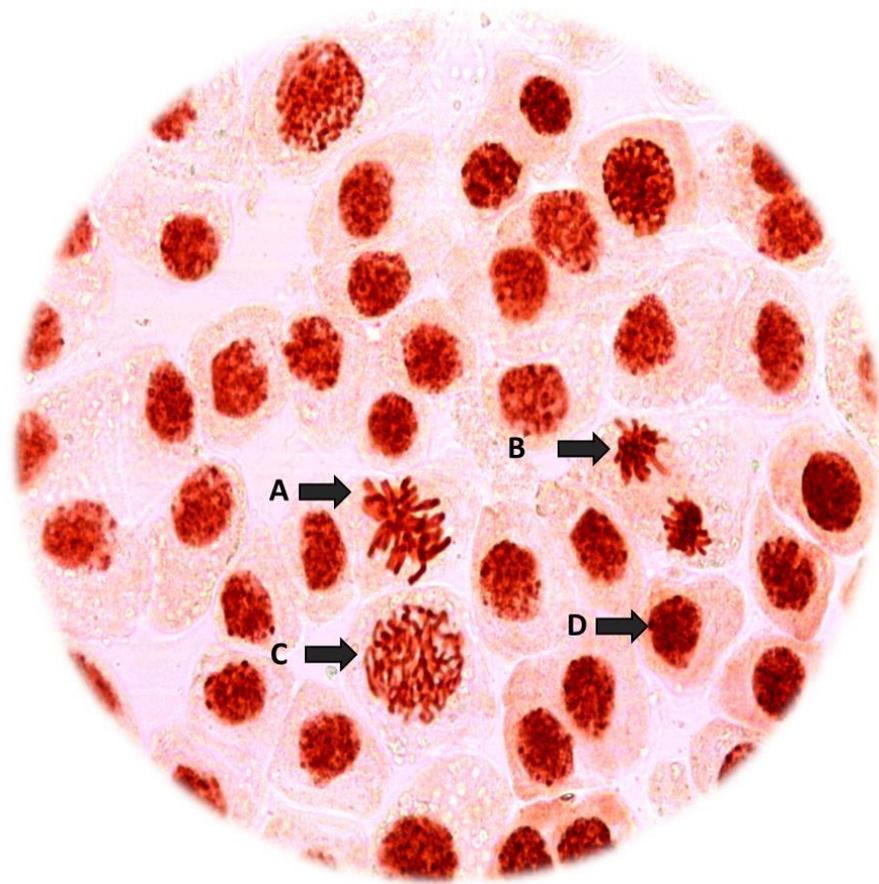


Figura 29. Células en las diferentes fases de mitosis. 400 X. A. Metafase. B. Telofase. C. Profase. D. Interfase (Fase de reposo). Fuente: Los autores.

Objetivos

- 🌸 Identificar morfológicamente las características de la interfase y de las fases de la mitosis.
- 🌸 Reconocer las diferentes fases de la mitosis en el meristemo radical de cebolla.
- 🌸 Determinar el índice mitótico y los índices de las fases.

Materiales y reactivos

- 🌸 Microscopio
- 🌸 Porta y cubreobjetos
- 🌸 Vidrio de reloj
- 🌸 Mechero Bunsen
- 🌸 Bulbos de cebolla*
- 🌸 Toallas de papel*
- 🌸 Orceína acética
- 🌸 Solución fijadora (etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1)*
- 🌸 Guantes quirúrgicos*
- 🌸 Compás*
- 🌸 Marcador de vidrio*
- 🌸 Tapabocas*

 Papel toalla*

 Jabón antibacterial para lavado de manos

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes**

Procedimiento

1. Los bulbos de cebolla se colocan durante varios días sobre frascos con agua de la llave para estimular el crecimiento de las raíces. El agua se cambia cada 24 horas (Figura 30).



Figura 30. Procedimiento para obtener raíces de la cebolla. Fuente: Los autores.

2. Cuando las raíces alcanzan una longitud de 2 a 3 cm, se cortan (Figura 31) y se colocan en solución fijadora indefinidamente.

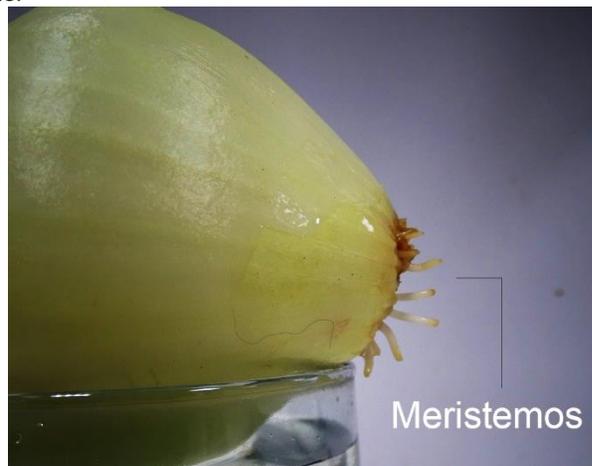


Figura 31. Raicillas (Tejido meristemático). Fuente: Los autores.

3. Coloque las raíces en un crisol, añada unas gotas de orceína acética y caliente a 60°C (hasta observar la formación de vapores), enfríe entre 5 y 10 minutos y repita el procedimiento 3 veces más. Para realizar este procedimiento debe usar tapabocas y guantes puesto que el trabajo con la orceína acética es peligroso
4. Coloque una muestra en un portaobjetos y con ayuda del cubreobjetos haga presión sin que se corra la laminilla.
5. Observe las preparaciones con el microscopio de luz, ubique las zonas que muestren figuras mitóticas, mediante el uso del objetivo de menor aumento.
6. Pase al objetivo de mayor aumento y reconozca las células que están en interfase y las que están en las diferentes etapas de la mitosis

7. Determine en índice mitótico (IM): número de células en mitosis/número de células totales contando no menos de 300 células.

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número de células totales}}$$

8. Simultáneamente, determine los índices de fases: número de células en la fase correspondiente/ número de células en mitosis.

$$\text{Índice profásico} = \frac{\text{Número de células en profase}}{\text{Número de células en división}}$$

$$\text{Índice metafásico} = \frac{\text{Número de células en metafase}}{\text{Número de células en división}}$$

$$\text{Índice anafásico} = \frac{\text{Número de células en anafase}}{\text{Número de células en división}}$$

$$\text{Índice telofásico} = \frac{\text{Número de células en telofase}}{\text{Número de células en división}}$$

9. Cuente como mínimo 300 células y clasifíquelas en el siguiente cuadro.

Campo/fase	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

**Cuestionario**

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Describa y esquematice las fases de la mitosis que observó durante la práctica.
2. ¿Por qué los cromosomas se tiñen de morado?
3. Indique cuál es la acción de un agente mitógeno y de uno mitostático. Dé ejemplos de ambos.
4. Defina cuál es la importancia de la meiosis y de la mitosis y en qué tipo de células se realizan.
5. Por qué se utilizan ápices radicales en estudios celulares, que ventaja representa su utilización.
6. Describa y esquematice la cariocinesis y la citocinesis, defina eucromatina y heterocromatina.
7. Existen células que se encuentran permanentemente en el ciclo celular, otras que están permanentemente fuera del ciclo y otras que están fuera del ciclo celular, pero bajo un estímulo adecuado pueden volver a dividirse, de ejemplos de cada uno de estos tipos de células y especifique las implicaciones que tiene este hecho.
8. Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

1. Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. El Mundo de la Célula. Pearson-Addison Wesley, México.
2. Bravo M. Enrique. 1995. Curso de Biología Celular. Programa temático, guías de estudio y laboratorio. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
3. Ducolomb Ivone, Fierro, Reina., González, Cristina., Ortiz Rocío., Rodríguez, Ernesto. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Celular. 2012. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalaca. México.
4. Karp, Gerald et al. 2011. Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos. Sexta edición. Editorial MC Graw Hill.
5. Paniagua R. et. Al. 2007. Biología Celular. Tercera edición. McGraw-Hill. Madrid.
6. Ville Claude A. 1996. Biología. Octava edición. Mc. Graw Hill.
7. Wallace R.A. *et al.*, 1991. Biología molecular y herencia. Ed. Trillas. Mexico D.F.
8. Revistas electronicas: *Journal of Cell, Cell, Journal of Eukaryotic Cell, Journal of Biochemistry Cell*

5.13. MEIOSIS

La meiosis es un proceso que consta de dos divisiones celulares consecutivas sin que haya replicación del ADN entre ellas. Su función es diferente a la de la mitosis ya que al final del proceso lo que se consigue es reducir el número cromosómico a la mitad, obteniendo gametos haploides en los organismos con reproducción sexual. La forma para conseguir esa reducción es que los cromosomas con el mismo tipo de información genética u homólogos se apareen primero para después segregarse a distintos polos celulares. Durante el apareamiento cromosómico y la sinapsis ambos homólogos pueden recombinarse, es decir, intercambiar segmentos cromosómicos, generando nuevas combinaciones alélicas en los cromosomas resultantes. Las diferentes combinaciones posibles de cromosomas paternos y maternos que puedan quedar incluidas en un gameto, como consecuencia de la segregación de homólogos, es otra fuente adicional de variabilidad genética.

Las dos divisiones celulares de la que consta la meiosis se denominan meiosis I (reduccional) y meiosis II (ecuacional). La meiosis I separa cromosomas homólogos y combina información genética y la segunda división reparte equitativamente las cromátidas que se habían replicado en la interfase premeiótica. En la meiosis también se distinguen cuatro etapas en cada una de las dos divisiones: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 27). Las características de cada etapa son las siguientes:

Meiosis I

Profase I. Es una etapa larga y compleja donde sucede uno de los aspectos más destacados del proceso meiótico: el sobrecruzamiento y la recombinación. Se divide en cinco subetapas: leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacinesis (Figura 32).

- **Leptotene.** Se caracteriza por el inicio de la condensación de los cromosomas que aparecen como una maraña dentro del núcleo. En este momento los cromosomas tienen dos cromátidas, pero aún no son visibles al microscopio.
- **Cigotene.** Esta es la etapa donde ocurre el fenómeno de sinapsis o apareamiento cromosómico en el que los cromosomas homólogos se asocian a lo largo de toda su longitud, lo que permite que más tarde puedan intercambiar segmentos cromosómicos (sobrecruzamiento) y recombinarse. Cada pareja de homólogos apareados constituye lo que se llama un bivalente, que consta de cuatro cromátidas.
- **Paquitene.** El grado de condensación cromosómica es mayor y los bivalentes aparecen más cortos y gruesos, permaneciendo los homólogos unidos a lo largo de toda su longitud. En esta etapa ocurre el sobrecruzamiento y la recombinación.
- **Diplotene.** Sigue aumentando la condensación de los bivalentes. Los cromosomas homólogos comienzan a separarse a nivel del centrómero, quedando unidos por unos puntos de contacto denominados quiasmas que son la manifestación citogenética del sobrecruzamiento. Sin embargo, las cromátidas hermanas de cada homólogo aún permanecen unidas. El número de quiasmas que se establece varía entre especies, poblaciones, individuos y tipo celular de que se trate. El tamaño del bivalente también determina el número de quiasmas que en él se organizan. En la meiosis femenina de la especie humana, por ejemplo, se observan una media de dos a tres quiasmas por bivalente siendo los cromosomas grandes los que muestran un mayor número de quiasmas.
- **Diacinesis.** Los bivalentes muestran ya un nivel muy alto de condensación, apareciendo como cuerpos gruesos. Los centrómeros de cada pareja de homólogos inician la orientación hacia polos opuestos. Al final de la diacinesis, y, por tanto, de la profase I, se desorganizan los nucléolos y la membrana nuclear, al igual que ocurría en la profase mitótica.

Metafase I. Los bivalentes exhiben su máximo grado de condensación. Los centrómeros de cada homólogo se unen a las fibras del huso reorganizándose en la placa metafásica. A diferencia de la metafase mitótica, sobre la placa ecuatorial se disponen parejas de cromosomas apareados o bivalentes (n bivalentes) en lugar de cromosomas aislados ($2n$).

Anafase I. Se produce la migración o segregación de los cromosomas homólogos de cada bivalente a polos opuestos. Este acontecimiento es de suma importancia ya que tiene como consecuencia la reducción del número cromosómico (n cromosomas en cada polo). Las cromátidas hermanas de cada cromosoma permanecen todavía unidas, pero solo a nivel del centrómero, a diferencia de la mitosis, donde los centrómeros se dividen y ambas cromátidas se separan completamente y segregan en la anafase mitótica.

Telofase I. Cuando finaliza la segregación anafásica de los homólogos, éstos se agrupan en ambos polos celulares. Los cromosomas se descondensan y reaparecen los nucleolos y la membrana nuclear. Finalmente se produce la citocinesis dando lugar a dos células hijas.

Meiosis II

La segunda división meiótica es muy similar al proceso mitótico, pero hay una serie de diferencias fundamentales. Cuando se inicia la meiosis II, los cromosomas ya están replicados y muestran dos cromátidas, por lo que en la interfase previa (o intercinesis) no hay replicación del ADN. Esta segunda división consta igualmente de cuatro etapas: profase II, metafase II, anafase II y telofase II.

Profase II. Es una etapa de corta duración donde aparecen n cromosomas con ambas cromátidas divergentes, como si se repelieran y unidas únicamente por su centrómero, lo que les da un aspecto de aspa.

Metafase II. Los n cromosomas se unen a las fibras del huso y se organizan en la placa metafásica.

Anafase II. Cada centrómero se divide y las cromátidas hermanas segregan hacia polos opuestos. En cada polo celular se observan n cromosomas con una sola cromátida.

Telofase II. Finaliza la migración de los n cromosomas con una sola cromátida y empiezan a descondensarse. Aparecen de nuevo el nucléolo y la membrana nuclear. Se lleva a cabo la citocinesis. Al final de todo el proceso meiótico se obtienen cuatro células haploides, con n cromosomas (Figura 32).

Materiales y reactivos

- 🌸 Microscopio
- 🌸 Flores de Agapanto*
- 🌸 Alcohol 70%
- 🌸 Hojas de bisturí*
- 🌸 Papel toalla*
- 🌸 Orceina acética
- 🌸 Vidrio de reloj o cápsula de vidrio
- 🌸 Mechero
- 🌸 Solución fijadora (etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1)
- 🌸 Guantes quirúrgicos*
- 🌸 Compás*
- 🌸 Tapabocas*
- 🌸 Jabón antibacterial para lavado de manos*
- 🌸 Bulbos de Astromelia (*Alstroemeria aurantiaca* D.Don)

***Los materiales señalados con asterisco deben ser suministrados por los estudiantes.**

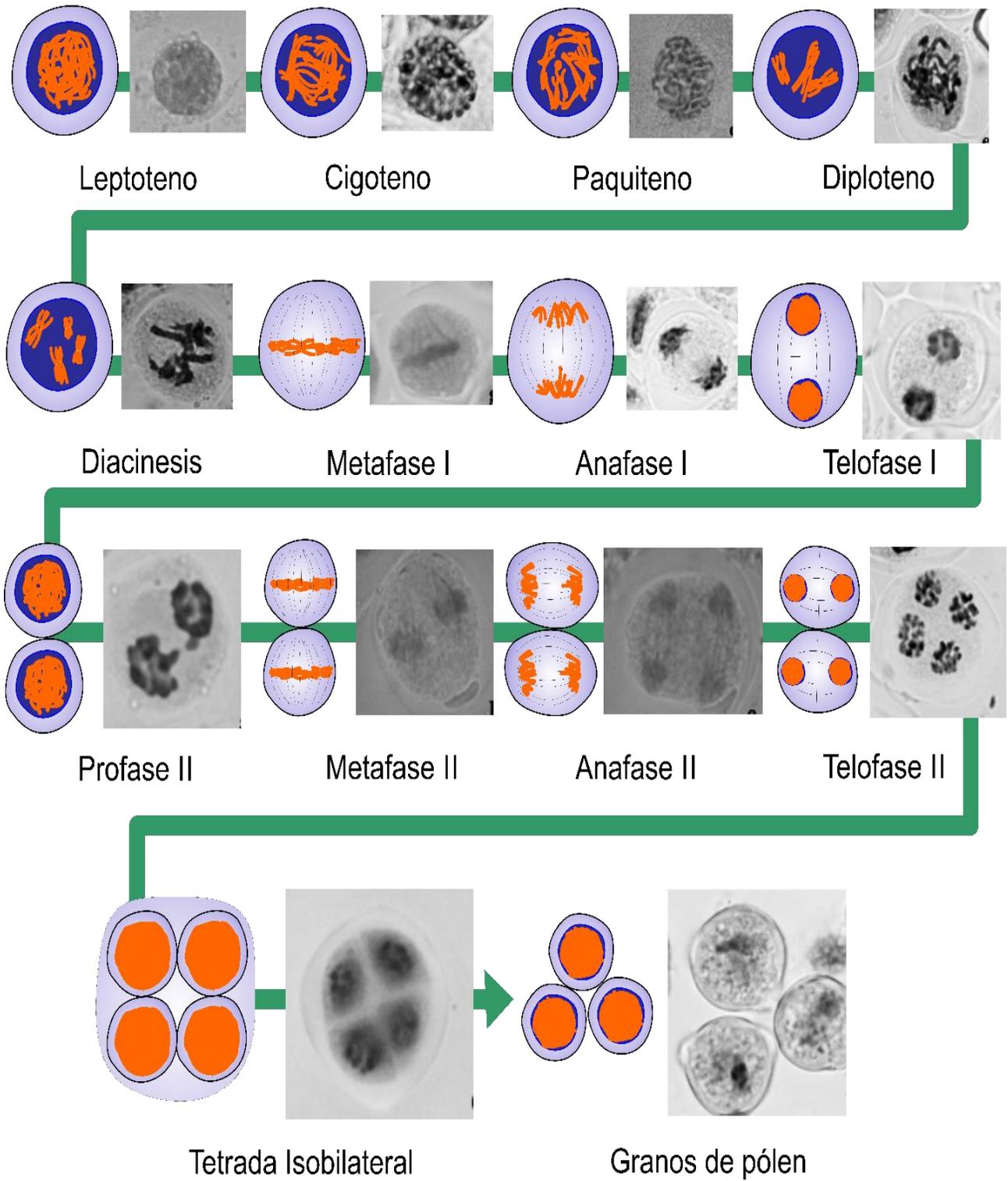


Figura 32. Células en las diferentes fases de meiosis. Fuente: Los autores.

Procedimiento

1. Colocar anteras de agapanto en solución fijadora con etanol y ácido acético durante 48 h previas a la práctica.
2. Con ayuda de un bisturí y agujas de disección seleccione las anteras más jóvenes (de color blanco).
3. Colóquelas en un crisol, añada unas gotas de orceina acética y caliente a 60°C (hasta observar la formación de vapores), enfríe entre 5 y 10 minutos y repita el procedimiento 3 veces más. Para este procedimiento debe usar guantes y tapabocas puesto que los vapores y el trabajo con orceina es peligroso
4. Coloque una muestra en un portaobjetos y con ayuda del cubreobjetos haga presión sin que se corra la laminilla.
5. Observe las preparaciones con el microscopio de luz, ubique en las microesporas, las zonas que muestren figuras meióticas, mediante el uso del objetivo de menor aumento.
6. Observe la placa en el objetivo de 40X y explorando en diferentes campos visuales hasta encontrar las diferentes etapas de la meiosis.
7. Ilustre cada una de las etapas que alcance a diferenciar (Figura 33).

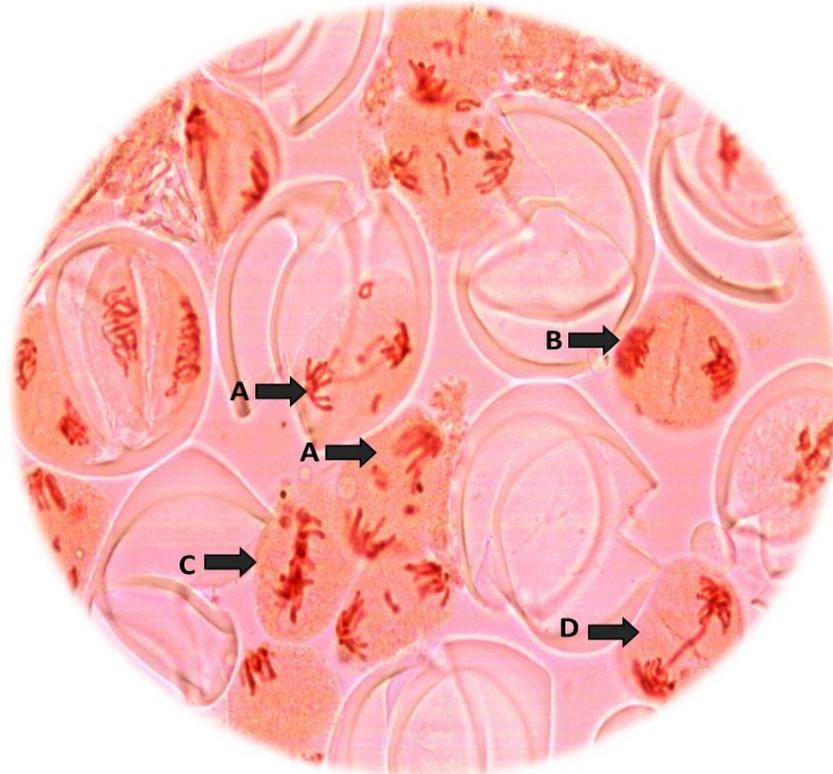


Figura 33. Células en las diferentes fases de meiosis. Observación realizada en anteras jóvenes de astromelia. 400 X. A. Anafase I. B. Telofase I. C. Metafase I. Fuente: Los autores.

**Cuestionario**

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Realice esquemas de las diferentes fases de la meiosis, el aumento correspondiente, las estructuras y la explicación de la fase meiótica que está usted observando.

2. ¿Por qué puede observar la meiosis en las inflorescencias y no en otros tejidos?
3. Durante la primera profase de la meiosis ocurre un evento de gran relevancia desde el punto de vista genético. Descríbalo.
4. Describir las diferencias entre la meiosis I y la meiosis II
5. ¿Tienen los dos polos de anafase I observadas, el mismo número cromosómico? ¿Y los polos de anafase II observadas?
6. Los niños nacidos con el síndrome de Patau tienen una copia extra del cromosoma 13, que conduce a desarrollar anomalías como el labio leporino y el paladar hendido, ojos pequeños y dedos de las manos y de los pies extra. Otro tipo de enfermedad genética denominada síndrome de Turner, se produce por la presencia de un único cromosoma sexual (cromosoma X). Los individuos nacidos con un único cromosoma X son mujeres que muestran pocos defectos aparentes hasta la pubertad, que es cuando no desarrollan senos normales ni órganos sexuales internos. Describa los acontecimientos meióticos que conducirían al nacimiento de un individuo bien con el síndrome de Patau o bien con el síndrome de Turner.
7. Suponga que tiene un organismo diploide en el que los cromosomas aportados por el espermatozoide tienen marcadores citológicos en los centrómeros que le permiten distinguirlos visualmente con respecto a los cromosomas aportados por el óvulo. ¿Se podría esperar que todas las células somáticas de este organismo tuvieran el mismo número de centrómeros maternos que maternos? Explíquelo. ¿Se podría esperar el mismo número de centrómeros maternos que paternos en cada gameto producido por este individuo? Explíquelo.

Bibliografía

1. Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. El Mundo de la Célula. Pearson-Addison Wesley, México.
2. Karp, G. 2009. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos. McGraw-Hill/Interamericana. México.
3. Paniagua R. et. al. 2007. Biología Celular. Tercera edición. McGraw-Hill. Madrid.
4. Ville Claude A. 1996. Biología. Octava edición. Mc. Graw Hill.
5. Wallace R.A. *et al.*, 1991. Biología molecular y herencia. Ed. Trillas. México D.F.
6. Revistas electrónicas: *Journal of Cell*, *Cell*, *Journal of Eukaryotic Cell*, *Journal of Biochemistry Cell*.