



MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA CELULAR





CONTENIDO

Página

I. PRESENTACIÓN

II. PRÁCTICAS

Práctica 1. Uso correcto del microscopio de campo claro, “la iluminación Koelher”

Práctica 2. Estudio al microscopio de células vivas

Práctica 3. Conteo celular, uso de la cámara de Neubauer

III. BIBLIOGRAFÍA

IV. ACTUALIZACIÓN





Presentación

En este manual de prácticas para el laboratorio de “Biología Celular” se incluyen experimentos y actividades básicos que por principio debe conocer el estudiante de medicina veterinaria y zootecnia, las cuales se complementan con el programa de estudios de la Unidad de aprendizaje.

La información contenida en el presente manual permitirá al estudiante vincular los aspectos teóricos con las actividades prácticas propuestas. Sin embargo, los temas propuestos corresponden a una pequeña parte de la información que deberá manejar el estudiante en forma práctica, por lo que al transcurrir el tiempo, será necesario aumentar la propuesta de actividades prácticas.

La biología celular es una ciencia fundamentada y reconocida como disciplina básica, que explora los procesos internos de la célula, describiendo todas las estructuras y características de las células (animales, vegetales, y seres unicelulares), las modificaciones en el curso de la vida de las células, su diversidad dentro de estos seres o a lo largo del desarrollo embrionario.

Actualmente, la biología celular, forma parte de los campos más importantes de la biología. El estudio de las propiedades de la célula permite comprender el funcionamiento y la constitución de las estructuras pluricelulares. Así, de ser una ciencia descriptiva, la biología celular se ha transformado en ciencia experimental, con el objetivo esencial de mejorar la comprensión de las estructuras y de los mecanismos a nivel celular y molecular.

De esta manera, los experimentos incluidos están diseñados para realizarse en las instalaciones y con equipos de laboratorio con que cuenta la facultad. Asimismo, la metodología incluida puede ser abordada por los estudiantes, permitiéndoles desarrollar sus habilidades en la medida de su propio interés e iniciativa, permitiendo el razonamiento, ya sea en trabajo individual o colectivo.





Práctica 1. Uso del microscopio de campo claro “Iluminación Koelher”

Introducción

El estudio de las ciencias biológicas siempre ha estado acompañado del uso del microscopio; su uso contribuyó en la formulación de la teoría celular. Hooke estudió las células de la superficie de una hoja, y las paredes celulares del corcho, consideradas por primera vez como unidad del organismo. Durtrochet escribió que todos los tejidos orgánicos estaban formados por células globulosas pequeñísimas de adhesión simple. Schleiden dijo: “Todos los organismos están compuestos de células”; Virchow dijo: “Donde haya una célula, debió haber antes una célula precursora”.

Los detalles microscópicos de la célula se hicieron evidentes al mejorar el diseño del microscopio, de tal manera que para el siglo XIX se lograron identificar casi todas las estructuras o componentes de la célula, las cuales actualmente pueden describirse con el uso de diferentes tipos de microscopios; sin embargo, el microscopio de luz es el más utilizado, permitiendo observar la estructura básica de la célula.

Con el microscopio compuesto, se pudieron apreciar organismos vivos cuya existencia era desconocida para los primeros investigadores. Los microscopios están formados por tres sistemas fundamentales: 1) el sistema mecánico, que es el sostén de los sistemas complementarios y que permite el ajuste del punto focal y las dioptrias; 2) el sistema óptico, que permite magnificar a diferentes grados la muestra observada y 3) el sistema de iluminación, que permite iluminar y concentrar los haces luminosos en el punto de interés, así como regular la intensidad de la iluminación.

Un aspecto clave para realizar una observación adecuada es lograr que penetre en la muestra la mayor cantidad de luz; esto se logra al centrar y condensar los haces luminosos provenientes de la lámpara sobre la muestra. Para este fin se utiliza la iluminación Koelher que como base fundamental está basada en dos diafragmas, un diafragma de campo situado sobre la lámpara y un diafragma de apertura situado debajo del condensador y en el uso de los tornillos para centrar la luz.

Objetivos

Que el alumno identifique las partes y los diferentes sistemas que componen a un microscopio de campo claro.

Que el alumno realice el ajuste del sistema de iluminación mediante la técnica de Koelher.

Que el alumno describa diferencias al observar una muestra en el microscopio de campo claro a diferentes aumentos con el sistema de iluminación no ajustado y con el sistema de iluminación ajustado según Koelher.





Material

Microscopio de campo claro
Laminilla con cortes histológicos
Preparaciones citológicas

Método

Se utiliza un microscopio de campo claro, que será previamente revisado por el profesor para desajustar el sistema de iluminación.

Se observarán preparaciones citológicas (proporcionadas por el profesor) realizadas en portaobjetos.

Secuencia de la técnica de observación

Antes de iniciar las observaciones revisar que el cable de conexión a la energía eléctrica se encuentre en buen estado; comprobar que el microscopio se encuentre limpio y se encuentren fijadas sus partes.

Conectar el cable a la alimentación eléctrica. Colocar la muestra en la platina.

Poner la muestra a la distancia focal apropiada para el alumno; se logra observando por los oculares y manipulando los tornillos macrométrico y micrométrico. Utilizar el objetivo de 10X.

Identificar el ocular con el tornillo de ajuste de dioptrías (en algunos modelos de microscopios ambos oculares cuentan con tornillo de ajuste de dioptrías).

Cubrir con un papel el ojo correspondiente al ocular con tornillo de ajuste y ajustar con el tornillo micrométrico a la distancia focal del ojo descubierto.

Cubrir con un papel el ojo correspondiente al ocular sin tornillo de ajuste y ajustar la distancia focal con el tornillo de ajuste de dioptrías del ocular.

Cerrar completamente el diafragma de campo. Ajustar la altura con el tornillo del condensador hasta observar nítidamente el contorno interno del diafragma de campo.

Centrar el haz de luz con ayuda de los tornillos del condensador; el área iluminada quedará al centro del campo visual.

Abrir lentamente el diafragma de campo hasta que el área iluminada cubra el 100% del campo visual.

Al cambiar de objetivo debe regularse la profundidad de campo. Esto se logra regulando el diafragma del condensador.

Cada estudiante deberá realizar el procedimiento descrito y en cada ocasión el profesor responsable deberá realizar desajustes a los microscopios.

Ciertos modelos de microscopio cuentan con un seguro que impide que la platina con la muestra hagan contacto con los objetivos; sin embargo, otros modelos no cuentan con tal dispositivo, por lo que la platina debe desplazarse hacia el objetivo procurando evitar el contacto. Cuando ocurre contacto, se corre riesgo de que se rompan las preparaciones y se rayen las lentes de los objetivos.





Precauciones

Al preparar frotis de sangre completa deben observarse medidas de bioseguridad básica como el uso de guantes de látex.
 Evitar cambio inadecuado de aumentos con los objetivos, para esta acción deberá realizar el movimiento usando el revólver del microscopio.
 Evitar que el objetivo tenga contacto directo con la muestra

Mecanismos de evaluación

Para evaluar el desempeño del estudiante se debe considerar el uso adecuado del microscopio de campo claro, los resultados obtenidos, el respeto al reglamento de laboratorio así como la realización de las siguientes actividades:
 Reporte escrito de la práctica (individual), describir esquemáticamente el centrado del sistema de iluminación en un microscopio de campo claro y complicaciones durante el proceso.

Cuestionario.

¿Qué es lo que actualmente definimos como un microscopio?

¿Qué es un microscopio simple?

¿Cuál es la diferencia entre microscopio simple y uno compuesto?

Menciona las diferencias que observaste al utilizar los lentes de diferente aumento:

¿Qué dificultades tendrías si al iniciar un trabajo lo hicieras con la lente de mayor aumento?





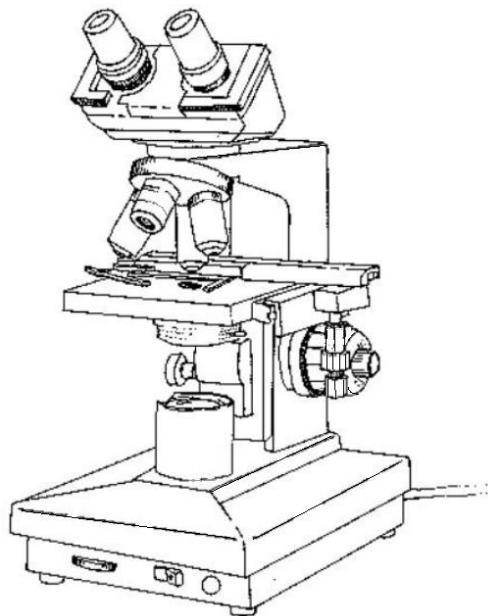
¿Cuál es la importancia del uso del microscopio en el campo de la biología celular?

¿Por qué se utiliza aceite de inmersión con el objetivo 100X?

Investigación complementaria:

Concepto de amplificación
Concepto de resolución
Diferencia entre amplificación y resolución
Como se determina el aumento final de la muestra.

En el siguiente esquema coloca el nombre de cada parte del microscopio:



Fuente: <http://academic.uprm.edu/~jvelezg/lab4estudiantes.htm>





¿De qué estructuras está compuesto el sistema mecánico?

¿De qué estructuras está compuesto el sistema óptico?

¿De qué estructuras está compuesto el sistema de iluminación?





Práctica 2. Estudio al microscopio de células vivas

Introducción

El ojo humano puede distinguir a 25 cm dos objetos separados entre sí 0,2 mm. Esto es el poder separador o poder de resolución del ojo. Sin embargo, las células animales suelen medir unos 0,01 mm, por lo que no es posible verlas a simple vista y mucho menos observar detalles estructurales en ellas. El microscopio permite su observación al aumentar el poder de resolución del ojo.

El microscopio es, para el estudiante de medicina veterinaria y zootecnia, un instrumento muy útil para conocer y comprender la estructura de las células. En esta práctica el estudiante utilizará el microscopio de campo claro para examinar células animales y vegetales. Primero, observará las células de un trozo de epidermis de cebolla, también observará algunas células descamadas de la parte interna de su mejilla.

Material

Cebolla
Caja de cultivo bacteriológico
Microscopio compuesto
Portaobjetos
Cubreobjetos
Agujas
Palillos
Pipeta o gotero
Solución de lugol
Solución de azul de metileno
Aceite de inmersión
Papel absorbente
Pinzas
Palillos de dientes

Objetivo

Que el alumno identifique las diferencias estructurales entre células animales y células vegetales.

Habilidades y destrezas

El alumno demostrará el correcto uso del microscopio de campo claro. Distinguirá la estructura de la célula animal y la estructura de la célula vegetal en preparaciones frescas.





Método

1.- Colocar una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos. Con unas pinzas, desprender la epidermis de la superficie cóncava de una capa de la cebolla. La capa epidérmica deberá ser transparente.

2.- Colocar en el portaobjetos el trozo de epidermis de cebolla no mayor que el diámetro de la gota de agua. Con agujas o con los palillos, extienda cualquier doblez de la epidermis sin romperla. Coloque un cubreobjetos sobre esa epidermis. NO aplique presión alguna sobre el cubreobjetos.

3.- Con un trozo de papel absorbente, seque el agua que aparezca fuera del cubreobjetos.

Nota: La parte superior del cubreobjetos y las lentes del microscopio deberán estar, siempre, libres de agua.

4.- Coloque la preparación sobre la platina del microscopio de campo claro y observarla con objetivos 4X, 10X, 40X y 100X

En los espacios de abajo, dibuja como se observa su preparación en los diferentes objetivos.

5.- Realice otra preparación húmeda de epidermis de cebolla. Pero ahora coloque en el portaobjetos una gota de solución colorante, como solución de lugol o azul de metileno en lugar de la gota de agua. Examine las preparaciones, por separado, obsérvelas con los objetivos 4X, 10X,

40X y 100X y dibuja lo que se observó.





Notas:





Preparación de célula animal

- 6.- Poner una gota de solución de azul de metileno o de lugol en el centro de un portaobjetos. Frotar suavemente el interior de su mejilla con un palillo de dientes. No frote hacia atrás y hacia adelante, sino en una sola dirección, separando el palillo después de cada movimiento (nota: aunque no se vea material en el palillo se habrán colectado muchas células).
- 7.- Separar el material colectado, golpeando suavemente el palillo en la gota de colorante del portaobjetos. Con el palillo, extienda el material en la gota del colorante.
- 8.- Cubrir la preparación cuidadosamente con un cubreobjetos y secar la superficie de alrededor.
- 9.- Colocar la preparación sobre la platina del microscopio de campo claro y observarla con los objetivos 4X, 10X, 40X y 100X.

Dibujar en los espacios de abajo como se observa la preparación.

Modo de evaluación

El desempeño del estudiante se evaluará considerando el uso adecuado del microscopio de campo claro, los resultados obtenidos de las preparaciones de las diferentes células, el respeto al reglamento de laboratorio así como la realización y entrega de las siguientes actividades:

- a) Reporte por escrito de la práctica
- b) Evaluación de sus observaciones (dibujos)





Questionario:

¿En cuál de las preparaciones se observan más detalles de la estructura celular?

¿Por qué se usan colorantes en las preparaciones celulares?

¿Por qué la pared celular es más fácil de observar que las estructuras de las áreas internas de la célula?

¿Cómo puede distinguirse el citoplasma granular de las vacuolas celulares?





Práctica 3 Conteo celular, uso de la cámara de Neubauer

Introducción

En “Biología Celular” es común trabajar en situaciones donde es necesario conocer el número de células presentes en un volumen dado; por ejemplo, cuando se realizan cultivos celulares se precisa saber cuantas células se encuentran en un momento x (t_1) con respecto al número de células que inicialmente se sembraron (t_0), o cuando se requiere que un determinado número de células sean expuestas a tratamientos distintos y ver sus efectos. Otro ejemplo es cuando se aplica en reproducción de animales y se desea saber cuántos espermatozoides hay en los eyaculados. En tales casos se requiere de un instrumento que permita contar directamente, o bien, calcular la concentración celular en un medio.

Para resolver el problema de conteo celular, se ha optado, en algunos casos por calibrar sistemas espectrofotométricos, cuyo fundamento se finca en las propiedades de absorción de la luz por parte de las células; sin embargo, tales sistemas son poco exactos y los resultados que se obtienen son difíciles de repetir. Una alternativa a este problema es contar directamente el número de células presentes en un volumen conocido; esto puede ser un trabajo agobiante si consideramos, por ejemplo, a las células procariontes que miden generalmente menos de 10 micras ($>1 \times 10^{-6}$ metros o 1×10^{-3} milímetros o bien 0.010 milímetros) y por lo tanto se pueden encontrar muchas en un volumen muy pequeño. No obstante, se cuenta con la cámara de Neubauer, la cual es un instrumento muy útil que permite contar células de distintos tamaños.

El hemocitómetro tiene la apariencia de un portaobjetos grueso, que en una cara tiene una placa muy delgada de metal, la cual se encuentra grabada con un par de cuadrículas muy finas y de medidas definidas (Figura 1). Esta cámara cuenta también con un par de muescas que permiten colocar la muestra a analizar en dos compartimientos. Por último, la cámara de Neubauer se complementa con un cubreobjetos cuyo grosor es mayor, también, que el de los cubreobjetos convencionales.

La altura entre el portaobjetos y el cubreobjetos se encuentra definida, así como el área de la cuadrícula en el portaobjetos; por lo tanto, es posible calcular el volumen contenido en cada compartimiento de la cámara de Neubauer. De esta manera, es posible conocer el volumen de muestra celular que se coloca en la cámara, ahora solo resta conocer el número de células presentes en ese volumen. Ver la Nota 1.

Objetivos

Que el estudiante conozca y realice un conteo celular con el uso correcto de una cámara de Neubauer

Que el docente realice los cálculos necesarios para estimar el número celular de una suspensión celular





Habilidades y destrezas

Uso correcto de la cámara de Neubauer

Calculo correcto del número de células presentes en distintas diluciones de una suspensión celular

Material

Microscopio de campo claro

Cámara de Neubauer

Cubreobjetos

Agua destilada

Micropipeta 250 μ l

Método

Diluir en 100 mL de agua destilada un gramo de levadura seca comercial. Agitar hasta que la muestra se vea homogénea.

Pipetear 100 μ l de la muestra celular con una micropipeta y colocar en una muesca de la cámara de Neubauer y permitir que la suspensión ingrese a la cámara por capilaridad. Evitar que se formen burbujas.

Colocar la cámara en la platina de un microscopio de campo claro con iluminación Kohler y utilizar el objetivo de 10X para localizar el cuadro central de la cámara. La cuadrícula que se utiliza como guía para el conteo es la e 0,2 X 0,2 mm. Tener cuidado de no contar dos veces la misma célula.

Para conocer el número de células en la muestra original realizar el siguiente cálculo: $A \times B \times C$

Donde A= Células en la cámara

B= Factor de dilución

C= Factor de corrección (proporcionado por el fabricante de la cámara)

Considerar:

Que el área central de la cámara es de 1mm². Esta área está subdividida en 25 cuadrados pequeños (1/25 mm²); cada uno de los cuales está delimitado por líneas triples y con una subdivisión de 16 (1/400 mm²).

Que generalmente la cámara tiene una profundidad de 0,1 mm.

El factor de corrección de 10⁴ convierte 0,1 mm³ a 1 mL (0,1 mm³ = 1 mm² X 0,1).

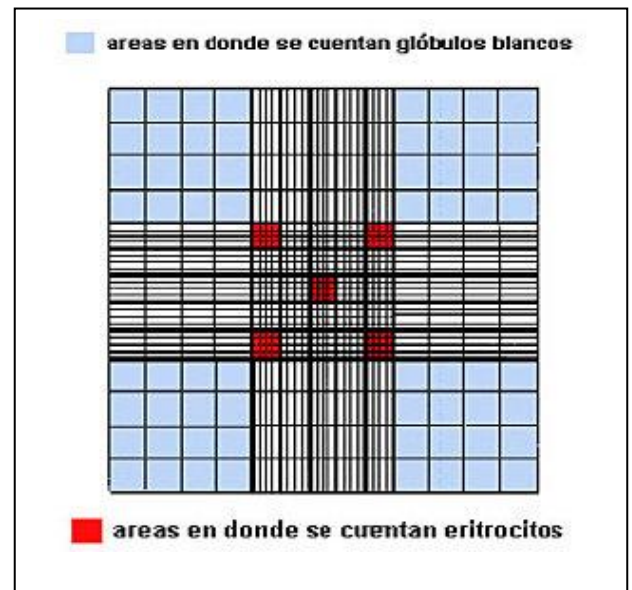
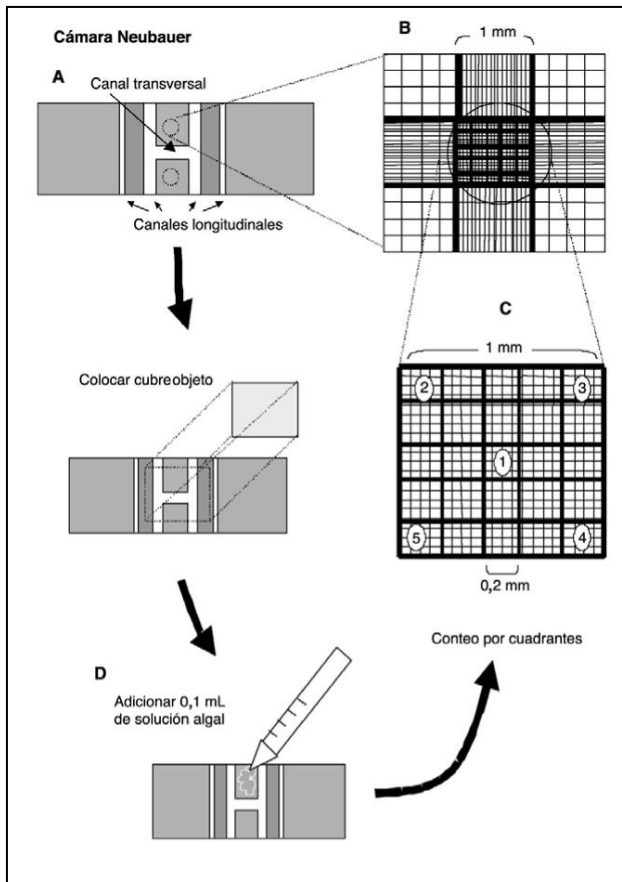
Mecanismos de evaluación

Para evaluar el desempeño del estudiante se debe considerar el uso adecuado del equipo de laboratorio, los resultados obtenidos, el respeto al reglamento de laboratorio así como la realización de las siguientes actividades:

- 1) Reporte escritos de la práctica
- 2) Búsqueda de dos artículos científicos en donde se utilice la cámara de Neubauer
- 3) Problema: en una cámara de Neubauer se contaron 167 y 186 espermatozoides de una suspensión celular diluida 1:25. Pregunta: ¿Cuál es el número de espermatozoides/mL en la suspensión original?



Nota 1. La altura entre el portaobjetos y el cubreobjetos puede cambiar en función del fabricante; por lo tanto, también puede variar el volumen de la muestra contenida en los compartimientos de la cámara. Lo anterior tiene dos implicaciones: 1) los cálculos que deben realizar para conocer el número de células presentes en una muestra serán distintos en función del fabricante de la cámara, y 2) siempre se deberá citar al fabricante de la cámara y de ser posible también el modelo, con objeto de dar a conocer las condiciones exactas del trabajo realizado.



Bibliografía

Jiménez L F y Merchant H.: Biología Celular y Molecular. Prentice Hall. 2003. México

Karp G.: Biología Celular y Molecular. McGraw-Hill Interamericana. 1996. México





IV. ANEXOS

Sin anexos

V. ACTUALIZACIÓN

Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Celular. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, estado de México; 27 de mayo de 2013.

Primera Edición

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA

Director:

Dr. en C. José Mauro Victoria Mora

Elaboró:

M en C. Luis Fernando Vega Castillo
Dr. César Ortega Santana

Revisó:

Dr. Rafael Cano Torres
Dr. Raúl Cuauhtémoc Fajardo Muñoz

