



Programa de Prácticas de Biología Celular

ORGANISMO ACADÉMICO: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia								
Programa Educativo: Medicina Veterinaria y Zootecnia				Área de docencia: Básica				
Aprobación por los H.H. Consejos Académico y de Gobierno		Fecha: 28/08/2013		Programa elaborado por: Dr. Andrés Aragón Martínez M en C. Luis Fernando Vega castillo Programa revisado por: Dr. Cesar Ortega Santana M en C. Luis Fernando Vega Castillo			Fecha de elaboración: 22/02/2008 Fecha de revisión: Julio de 2013	
Clave	Horas de teoría	Horas de práctica	Total de horas	Créditos	Tipo de Unidad de Aprendizaje	Carácter de la Unidad de Aprendizaje	Núcleo de formación	
L43703	4	2	6	10	CURSO	OBLIGATORIA	BÁSICO	
Prerrequisitos Bases de Química y Biología Dominio básico del idioma inglés a nivel de comprensión de lectura		Unidad de Aprendizaje Antecedente NINGUNA				Unidad de Aprendizaje Consecuente FISIOLOGÍA		
Programas educativos en los que se imparte: LICENCIATURA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA								



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

Introducción

Con el advenimiento del microscopio compuesto, en el que se utiliza más de una lente para magnificar la observación de objetos minúsculos, se pudieron apreciar organismos vivos cuya existencia era desconocida para los primeros investigadores. Actualmente, los microscopios están formados por tres elementos fundamentales: 1) el sistema mecánico, que sostiene al resto de los elementos y que permite el ajuste del punto focal y de las dioptrías; 2) el sistema óptico, que permite magnificar a diferentes grados el espécimen observado 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 incida sobre el espécimen la mayor cantidad de luz; esto se logra al centrar y condensar los haces luminosos provenientes de la lámpara sobre el espécimen. La iluminación Koelher se compone de dos diafragmas, un diafragma de campo situado sobre la lámpara y un diafragma de apertura situado debajo del condensador.

Objetivos

1. Que el alumno identifique los diferentes sistemas que componen a un microscopio de campo claro
2. Que el alumno practique el centrado del sistema de iluminación mediante la técnica de Koelher
3. Que el alumno describa las diferencias cuando se observa un espécimen en un microscopio de campo claro a diferentes aumentos con el sistema de iluminación no centrada y cuando se observa con el sistema de iluminación centrado según Koelher



Habilidades y destrezas

1. Manejo correcto de un microscopio de campo claro
2. Centrado del sistema de iluminación de un microscopio de campo claro

Material y métodos

En función del número de alumnos el profesor debe considerar la pertinencia de organizar equipos, se recomienda que cada equipo conste de un máximo de cuatro dicentes por cada microscopio disponible.

Se utilizará un microscopio de campo claro al cuál será previamente revisado por el profesor para descentrar el sistema de iluminación. Se observaran preparaciones citológicas (proporcionadas por el profesor) realizadas en portaobjetos.

Secuencia de la técnica de observación:

1. Antes de iniciar las observaciones revisar visualmente que el cable de conexión a la energía eléctrica se encuentre en buen estado; comprobar que el microscopio se encuentre limpio y que se encuentren fijadas todas sus partes.
2. Conectar el cable a la alimentación eléctrica. Colocar el espécimen en la platina y fijarlo. Poner el espécimen a la distancia focal apropiada para el observador, esto se logra observando por los oculares y manipulando los tornillos macrométrico y micrométrico. Utilizar el objetivo de 10X.
3. 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.
4. Cerrar completamente el diafragma de campo. Ajustar el tornillo del condensador hasta que se observe nítidamente el contorno



interno del diafragma de campo. Colocar, con ayuda de los tornillos del condensador, el área iluminada al centro del campo visual.

5. Abrir lentamente el diafragma de campo hasta que el área iluminada cubra el 100% del campo visual.
 6. Al cambiar de objetivo debe regularse la profundidad de campo. Esto logra regulando el diafragma del condensador.
- Observación: Cada docente deberá realizar el procedimiento descrito y en cada ocasión el profesor responsable deberá realizar desajustes a los microscopios.

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

- Precauciones: Si se preparan frotis de sangre completa deben observarse medidas de seguridad básica como son el uso de guantes de látex.
 - Evitar el cambio de aumentos con los objetivos, para esta acción deberá de usar el revolver
 - Evitar que el objetivo tenga contacto directo con la muestra

Mecanismos de evaluación

Para evaluar el desempeño del docente 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:



1. Reporte de la práctica (Por equipo)
2. Describir esquemáticamente el centrado del sistema de iluminación en un microscopio invertido
3. Pregunta: ¿A que se refiere la “profundidad de campo”?

Practica 2. Estudio al microscopio de células vivas

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

MATERIAL

Cebolla
Capsula o caja de cultivo
Microscopio compuesto
Portaobjetos
Cubreobjetos
Agujas
Pipeta o gotero
Solución de lugol
Solución de azul de metileno
Papel absorbente
Pinzas
Palillos de dientes

Objetivo: Conocer las diferencias entre una célula animal y una célula vegetal

Habilidades y destrezas: El docente demostrará el correcto uso del microscopio de campo claro, así como el de distinguir en preparaciones la estructura de la célula animal y la estructura de la célula vegetal



Método:

- 1.- Coloque una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos. Con unas pinzas, desprenda la epidermis de la superficie cóncava de una capa de la cebolla. La capa epidérmica deberá ser transparente.
 - 2.- Coloque en el portaobjetos un 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 cualquier gota de 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 patina del microscopio de campo claro y obsérvela con los objetivos 4X, 10X, 40X y 100X
En los espacios de abajo dibuje como observa su preparación.

	4X
	40X

	10X
	100X



5.- Realice de nuevo otra preparación húmeda de epidermis de cebolla. Pero ahora coloque en el portaobjetos una gota de solución colorante, como solución de lugol, en lugar de la gota de agua. Examine las preparaciones, por separado, con los objetivos 4X, 10X, 40X y 100X.

	4X
	40X

	10X
	100X



Preparación de célula animal

6.- Ponga una gota de solución azul de metileno o de lugol en el centro de un portaobjetos. Frote, suavemente, el interior de su mejilla con un palillo de dientes. No frote hacia atrás y hacia adelante, sino en una dirección, separando el palillo después de cada movimiento. Aunque no vea material en el palillo habrá colectado muchas células.

7.- Separe 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.- Cubra la preparación, cuidadosamente, con un cubreobjetos y seque la superficie de su alrededor.

9.- Coloque la preparación sobre la patina del microscopio de campo claro y obsérvela con los objetivos 4X, 10X, 40X y 100X

En los espacios de abajo dibuje como observa su preparación.

	4X
	40X

	10X
	100X



Mecanismos de evaluación

Para evaluar el desempeño del docente se debe considerar 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 de las siguientes actividades:

Reporte de la práctica (Por equipo)

Describir esquemáticamente el centrado del sistema de iluminación en un microscopio invertido

Preguntas:

1. ¿En cuál de las preparaciones observa más detalles de la estructura celular?
2. ¿Por qué se usan colorantes en las preparaciones celulares?
3. ¿Por qué la pared celular es más fácil de observar que las estructuras de las áreas internas de la célula?
4. ¿Cómo puede distinguirse el citoplasma granular de las vacuolas celulares?

Practica 3 Conteo celular, Uso de la cámara de Neubauer

Introducción

En Biología Celular es común el encontrarse con la necesidad de conocer el número de células que 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 bien, para saber cuantos espermatozoides hay en los eyaculados de diferentes pacientes. 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 el 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, las cuales miden generalmente menos de 10 micras ($>1 \times 10^{-6}$ metros o 1×10^{-3} milímetros o bien 0.010 milímetros -revisar el anexo A para saber más acerca de las unidades de medidas utilizadas comúnmente en Biología Celular) y por lo tanto se pueden encontrar muchísimas 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 distinto tamaño.

La cámara de Neubauer tiene la apariencia de un portaobjetos grueso, que en una cara tiene una placa muy delgada de metal, la cuál se encuentra grabada con un par de cuadrículas muy finas y de medidas definidas (Figura 1, poner una fotografía .- una fotografía de la cámara completa y una desde la vista del microscopio para apreciar la cuadrícula, hacer el pie de figura-). La cámara de Neubauer 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. Entonces, 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

1. Que el discente conozca y practique el uso correcto de una cámara de Neubauer
2. Que el dicente se ejercite en los cálculos necesarios para estimar el número celular de una suspensión celular



Habilidades y destrezas

1. Uso correcto de la cámara de Neubauer
2. Cálculo correcto del número de células presentes en distintas diluciones de una suspensión celular

Material y métodos

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= de células en la cámara

B= Es el factor de dilución y

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

Considerar que el área central de la cámara es de 1 mm^2 . Esta área es subdividida en 25 cuadrados pequeños ($1/25\text{ mm}^2$); cada uno de los cuales está delimitado por líneas triples y con una subdivisión de 16 ($1/400\text{ mm}^2$). Que generalmente la cámara tiene una profundidad de 0,1 mm.

El factor de corrección de 10^4 convierte $0,1\text{ mm}^3$ a 1 ml ($0,1\text{ mm}^3 = 1\text{ mm}^2 \times 0,1$).



Mecanismos de evaluación

Para evaluar el desempeño del disente 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 de la practica (Por equipo)
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 un 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 también puede variar el volumen de la muestra que contenida en los compartimientos de la cámara. Lo anterior tiene dos implicaciones: 1) los cálculos que deben realizarse para conocer el número de células presentes en una muestra serán distintos en función del fabricante de la cámara, y 2) siempre, necesariamente deberán citarse el fabricante de la cámara y de ser posible también el modelo, con objeto de dar a conocer al lector las condiciones exactas del trabajo realizado.