



Práctica 2

MONTAJE, COLORACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

OBJETIVOS

- Aprender y aplicar las técnicas básicas de coloración de material biológico, para diferenciar estructuras en células animales y vegetales.
- Determinar la utilidad de las diferentes técnicas de tinción en el estudio de microorganismos.

MATERIALES QUE SE DEBEN LLEVAR A CLASE (por grupo)

- 1. Una papa pequeña
- 2. Una cebolla cabeza pequeña
- 3. Una caja de colores

MARCO TEÓRICO

Las células son las unidades estructurales que componen todos los seres vivos. Para entender el funcionamiento de las plantas y de los animales es necesario conocer la estructura y el funcionamiento de dicha UNIDAD BÁSICA. Dado que para observar la estructura es necesario el uso del microscopio, se han desarrollado diversas técnicas de montaje y coloración de los materiales biológicos con el fin de lograr una mayor resolución y diferenciación de los componentes celulares (Montuenga *et al.*, 2009).

1. COLORACIONES

Una característica que presentan los organismos es poseer una gran proporción de agua en sus células. El fenómeno de refringencia presentado por el agua obligó a los biólogos a encontrar técnicas como el uso de colorantes para que facilitaran la visión de componentes celulares y tisulares; colorantes cuyo origen sea animal o vegetal se han denominado naturales (Montuenga *et al.*, 2009, Bancroft & Gamble,

2008)

La mayoría de nosotros ha oído hablar de la relación existente entre la constitución de las sustancias y la proporción selectiva de las ondas del espectro luminoso, lo cual produce el color, propiedad atribuida a los CROMÓFEROS, los cuales son sustancias que en su estructura poseen enlaces covalentes dobles (la acumulación de estos dobles enlaces es lo que hace coloridas a las sustancias), como el caroteno y las xantofilas. Aquellos compuestos que tengan en su estructura uno o más grupos cromóferos reciben el nombre de CROMÓGENOS. Estos son considerados colorantes biológicos cuando poseen la capacidad de ser absorbidos por las células o por los tejidos. Para que un colorante sea útil para la tinción biológica deben poseer un grupo cromófero y otros grupos que le cedan las propiedades de un electrolito, estos últimos reciben el nombre de AUXOCROMOS, los cuales pueden ser ácidos como el H^+ ó básicos como el OH^- (Horobin *et al.*, 2002, Bancroft & Gamble, 2008)

Todos estos grupos poseen una alta afección por el hidrógeno. La afección de un colorante por el hidrógeno hace que este presente color. La hidrogenación total produce decoloración. A pesar de esto, existen colorantes que recuperan su color mediante una oxidación moderada, estos compuestos se llaman LEUCOCOMPUESTOS (Horobin *et al.*, 2002).

2. TEORÍAS DE LA COLORACIÓN

Existen dos teorías principales que explican el fundamento de la coloración: la física y la química. Estas teorías deben resolver dos problemas: la penetración del colorante y la fijación del mismo (Ochei & Kolhatkar, 2000).

En general, se acepta a la penetración del colorante como un fenómeno osmótico. Su fijación, sin embargo, se debe según la primera teoría al fenómeno de adsorción y según la química a la unión de las moléculas del colorante y los constituyentes del material a colorear (Ochei & Kolhatkar, 2000). De allí que otra clasificación de los colorantes se basa en la unión de ellos a ciertas regiones de la célula según su pH en:

- **Colorantes ácidos:** Si su propiedad de teñir reside en el anión (parte negativa del colorante).
- **Colorantes alcalinos:** Cuando su propiedad de teñir reside en el catión (parte positiva del colorante).
- **Colorantes anfóteros:** Si se comporta como ácido o como básico dependiendo del pH.
- **Colorantes neutros:** Cuando anión y catión sean colorantes

Los dos primeros preservan su naturaleza aniónica o catiónica dentro del rango normal de pH usado en la coloración corriente.

3. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN

- **Vitales:** Si la acción del colorante no ocasiona muerte celular. Ej.: Azul de metileno.
- **Supravitales:** la acción de la mayoría de estos colorante no es compatible con la vida, es decir, se hace sobre material fijado. Estas se dividen en:
 - **Difusas**
 - **Directas:** Cuando el colorante se aplica directamente.
 - **Indirectas:** Cuando se aplica primero un mordiente.
 - **Progresivas:** Si se aplican diferentes colorantes a diferentes tiempos.
 - **Regresivas:** Cuando se realiza una sobrecoloración, seguida de una decoloración hasta el tono deseado.
 - **Selectas**
 - **Pancrómicas:** Cuando con un colorante se obtienen diferentes tonos.
 - **Totales:** Si se obtiene un solo tono con el colorante.
 - **Especiales**
 - **Fluorescencia:** La tinción del material celular se detecta por la emisión de luz fluorescente por parte del colorante.
 - **Negativas:** Si el colorante tiñe más el fondo que el espécimen.

4. CLASIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS COLORANTES (Según Horobin *et al.*, 2002)

- **Según la concentración de grupos H^+ y OH^- :**
 - **Ácidos:** Electronegativos, caracterizados por tener una alta concentración de hidrogeniones (H^+).
 - **Básicos:** Electropositivos, caracterizados por tener una alta concentración de grupos hidroxilo (OH^-).
- **Según origen y presencia de cromóferos**
 - **Simples:** Con uno o más cromóferos.
 - **Naturales:** Con un radical cetónico.
 - **Artificiales:** Con un radical benceno. Se extraen de la hulla y a su vez presentan grupos:
 - **Ácidos:** Selectivos para citoplasma, protoplasma y paredes lignificadas. Ej.: Eosina
 - **Básicos:** Selectivos para núcleo y paredes en proceso de lignificación. Ej.: Hematoxilina
 - **Compuestos:** Con cromóferos combinados. Ej.: Sudam III

4.1. Ejemplos de coloraciones

Coloración de Gram: se basa en las diferencias de la pared celular existentes entre las bacterias Gram positivas (con una capa gruesa de peptidoglicano y dos clases de ácidos teicoicos) y las bacterias Gram negativas, con una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. El cristal violeta de la tinción de Gram es fijado por la solución yodada, en este caso el lugol que actúa como mordiente (formado por I_2 , yodo en equilibrio con KI, yoduro de potasio). El lugol entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta. Al aplicar el alcohol – acetona (decolorante) las G (-) sufren la eliminación por extracción de grasas de las paredes celulares, por lo que aumenta la porosidad, dejando salir el cristal violeta, permitiendo el paso de cualquier sustancia como lo es la fucsina la cual al ser aplicada entra por los poros dejados con la decoloración y tiñe el citoplasma bacteriano de un tono rosado. En las G(+) al aplicar el decolorante se deshidratan las paredes celulares, contrayendo los poros, disminuyendo la permeabilidad, por lo que el complejo lugol – cristal violeta no sale de las células y estas continúan teñidas de color violeta (Murray *et al.*, 2006).

Coloración de Giemsa: se emplea principalmente para observar células sanguíneas. El colorante de Giemsa es un colorante compuesto ya que es una mezcla de varios colorantes y se basa en la distinta afinidad que demuestran las células y sus componentes a los distintos colorantes incluidos en este colorante. Los núcleos se teñirán en diferentes tonos de púrpura. El citoplasma se teñirá en diferentes tonos de azul a rosa claro. El citoplasma de algunas células puede presentar gránulos finos de rojizos a lila. Los basófilos demostrarán gránulos azul oscuro-negros en el citoplasma. Los eosinófilos demostrarán gránulos naranja brillante en el citoplasma. Los hematíes deben mostrar un color de rosa a naranja. Esta coloración también puede ser empleada para diferenciar hemoparásitos de células sanguíneas (Tomado de: recuperado 10 de diciembre 2010 en http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_es_gs10.pdf).

Coloración con Azul de Lactofenol: Este colorante está compuesto por lactofenol, el cual cumple funciones de medio de montaje, y el azul de algodón el cual cumple funciones de colorante. El lactofenol a su vez es una mezcla de fenol y ácido láctico. Los organismos suspendidos en lactofenol mueren rápidamente por la presencia de fenol, el cual actúa como un veneno en el citoplasma, precipitando las proteínas e inactivando enzimas esenciales del sistema. El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas. En altas concentraciones de fenol, las células no se lisan debido a la inactivación de las enzimas celulares líticas (que cumplen con la función de lisis). El azul de algodón es una tinción ácida que colorea la quitina y la celulosa. Es por eso que se utiliza en la tinción de hongos, pues estos poseen quitina en sus paredes celulares (Kavanagh, 2007, Bancroft & Gamble, 2008)

Coloración con Azul de Metileno: es un colorante cargado positivamente, se une a componentes celulares cargados negativamente. Estos componentes cargados negativamente se denominan basófilos, porque tienen afinidad por los colorantes

básicos. Por ejemplo, estos colorantes se unen al núcleo y ciertas regiones del citoplasma (Montuenga *et al.*, 2009, Bancroft & Gamble, 2008).

Coloración con Lugol: en este caso el almidón se colorea de azul-violeta en presencia del yodo del lugol, debido a la fijación del yodo en la superficie de la molécula del almidón. Esto permite resaltar organelos de reserva como los amiloplastos (Montuenga *et al.*, 2009).

PRECAUCIÓN

COMPUESTOS TÓXICOS

SUSTANCIA	RIESGOS	PRECAUCIONES
Lugol	Potencialmente tóxico.	No inhalar ni ingerir. Evitar el contacto con la piel. Lavar las manos con abundante agua tras su manipulación.
Azul de metileno	Mutagénico en células somáticas de mamíferos.	Tapabocas, gafas de seguridad y guantes.
Colorante de Giemsa	Puede causar irritación en los ojos, piel o tracto respiratorio.	Gafas de seguridad y guantes. Evite el uso de lentes de contacto durante su manipulación.
Cristal violeta	Irritante.	Gafas de seguridad y guantes. Evite el contacto con la piel.
Acetona	Muy inflamable. Irritante para los ojos. Contacto frecuente con la piel puede causar resequedad o resquebrajamiento. Los vapores pueden causar adormecimiento.	Gafas de seguridad, guantes y tapabocas. Nunca manipular usando lentes de contacto.
Azul de lactofenol	Corrosivo. Tóxico si es inhalado, si es ingerido o en contacto con la piel. Riesgo de efectos irreversibles.	Guantes y gafas de seguridad.

1. MATERIALES PARA LA PRÁCTICA CON CÉLULAS VEGETALES

MATERIALES		
INSTRUMENTAL BÁSICO	SOLUCIONES	MATERIALES
<ul style="list-style-type: none"> • Portaobjetos (Láminas) • Cubreobjetos (Laminillas) • Cuchillas • Microscopio 	<ul style="list-style-type: none"> • Lugol • Azul de Metileno 	<ul style="list-style-type: none"> • Papa • Cebolla

TÉCNICA DE PREPARACIÓN PARA MONTAJES HÚMEDOS

1. Coloque una gota de agua sobre un portaobjetos limpio
2. Coloque el objeto que va a observar dentro de la gota de agua.
3. Coloque un cubreobjetos en el mismo ángulo de 45° respecto a la lámina portaobjetos.

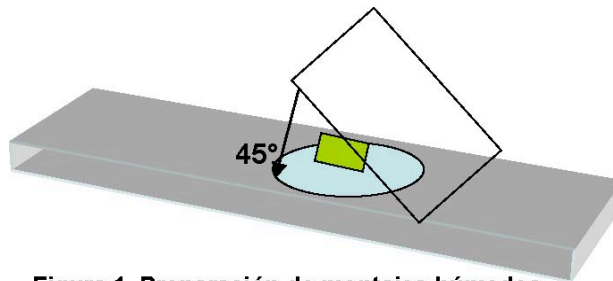


Figura 1. Preparación de montajes húmedos.

4. Acerque el cubreobjetos en el mismo ángulo a la gota de agua. Deje caer lentamente el cubreobjetos sobre la gota de agua intentando que no se formen burbujas de agua entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

1.1. Células en Corte de Papa

- Realice un corte de papa muy fino (casi transparente), enjuáguelo para sacar el exceso de almidón y efectúe el montaje según la técnica ya descrita.
- Observe los gránulos de almidón, añada una gota del reactivo de Lugol por el borde de la laminilla. Observe el cambio de coloración.

1.2. Células Epidérmicas del Bulbo de la Cebolla

- Tome un pedacito de una de las escamas internas del bulbo de cebolla, quite una porción muy pequeña de la epidermis y realice el mismo montaje utilizado anteriormente.
- Usted verá células hexagonales. Están vivas y dentro de las paredes hay una capa delgada de citoplasma.
- Busque un cuerpo circular o elíptico dentro de la célula: es el núcleo. Para verlo bien hay que cerrar el diafragma del microscopio.
- Luego busque los nucléolos. En el citoplasma también se observan corpúsculos muy pequeños, incoloros, que son los leucoplastos.
- Añada una gota del colorante Azul de metileno por el borde de la laminilla y observe.

2. MATERIALES PARA LA PRÁCTICA CON CÉLULAS ANIMALES

MATERIALES		
INSTRUMENTAL BÁSICO	SOLUCIONES	MATERIALES
<ul style="list-style-type: none"> • Portaobjetos (Láminas) • Cubreobjetos (Laminillas) • Lancetas • Algodón • Bandeja • Microscopio 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol • Metanol • Aceite de Inmersión • Giemsa 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangre

Extendido de Sangre Periférica.

Con la sangre obtenida por punción dactilar realizada por su profesor o monitor, siga las siguientes instrucciones:

Sobre una lámina limpiada previamente con alcohol, coloque la gota de sangre, y con la ayuda de otra lámina haga un extendido de sangre, el cual debe quedar con forma de cono y deje secar.

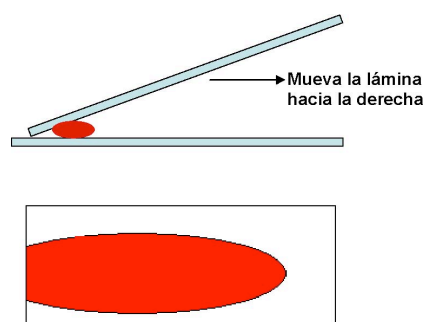


Figura 2. Extendido de sangre periférica (Tomado de <http://www.laboratoriosprovet.com.co/Portals/1/laboratorio/frotis%201.jpg>, el 9 de junio de 2009)

1. Trate el extendido totalmente con metanol hasta que este se evapore.
2. Cubra toda la lámina con colorante de Giemsa. Déjelo actuar por 15 minutos. Lave cuidadosamente la lámina con agua.
3. Observe al microscopio usando el objetivo de 100x y aceite de inmersión.
4. Identifique:
 - **Glóbulos rojos (eritrocitos):** células sin núcleo de forma bicóncava de color rosado grisáceo.
 - **Glóbulos blancos (leucocitos):** células de citoplasma gris y núcleo morado con diferentes formas.

- **Plaquetas:** Son restos de células de gran tamaño destruidas al pasar al torrente sanguíneo. Tiene un tamaño mucho menor que los glóbulos rojos o blancos. Son de color morado.

3. MATERIALES PARA LA PRÁCTICA CON BACTERIAS

MATERIALES		
INSTRUMENTAL BÁSICO	SOLUCIONES	MATERIALES
<ul style="list-style-type: none"> • Portaobjetos (Láminas) • Microscopio • Asas Rectas 	<ul style="list-style-type: none"> • Cristal violeta • Lugol • Alcohol-acetona • Fucsina de Gram • Aceite de Inmersión 	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo Bacteriano

Coloración de Gram

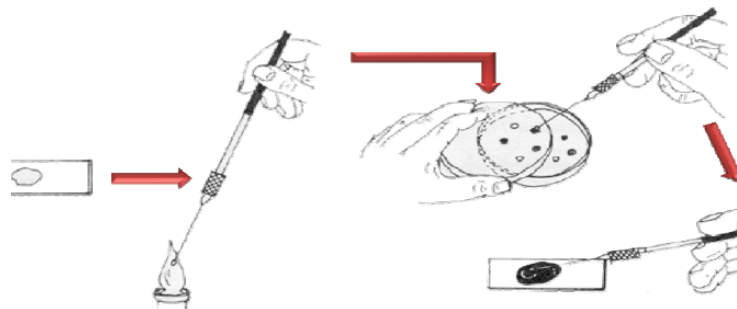
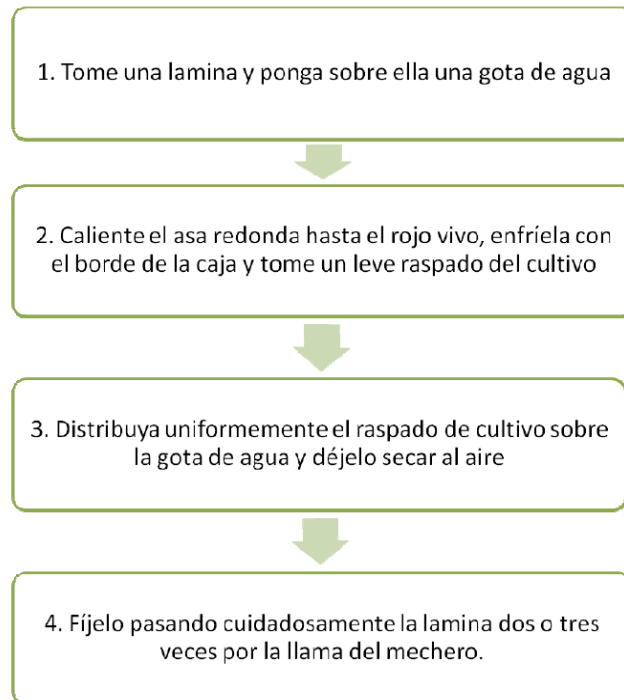


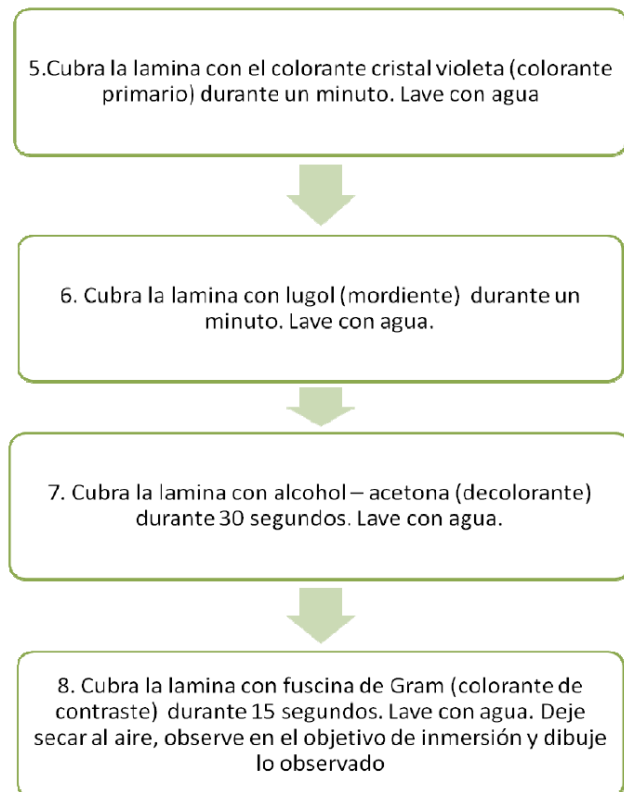
Figure 3. Fijación de muestra bacteriana sobre la lámina.

Tomado de http://mx.geocities.com/urtis_micro/sesiones/Gram_archivos/gram2.gif

3.1 Fijación de la muestra:



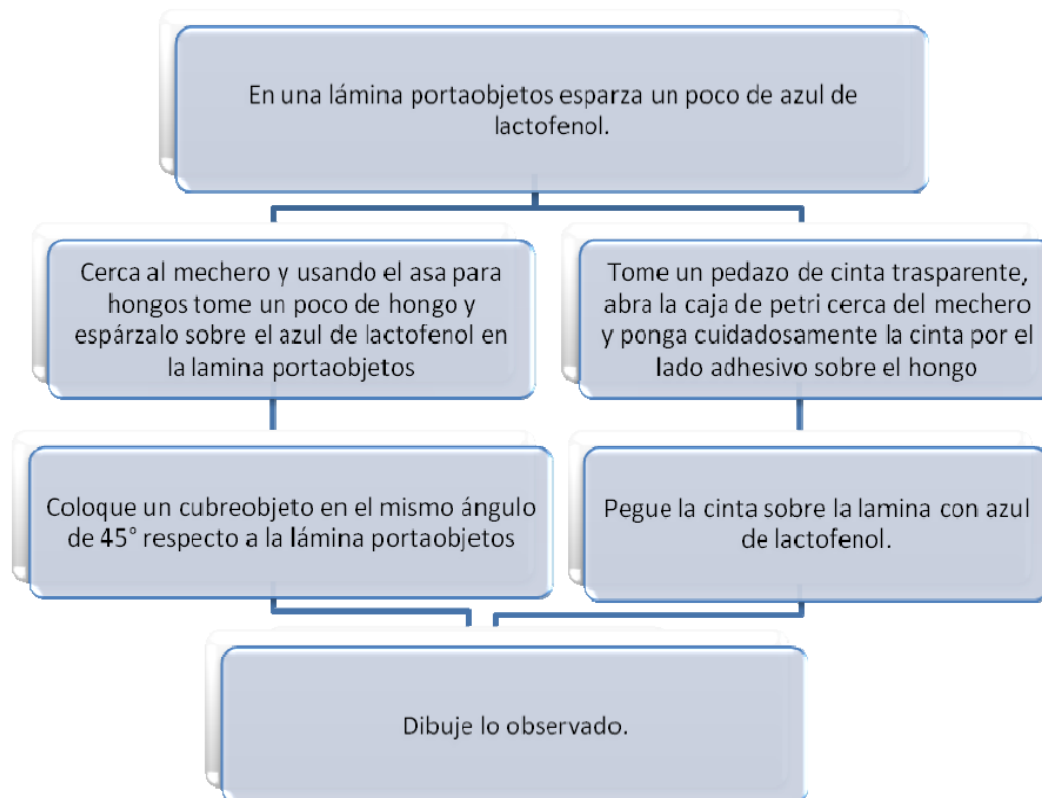
3.2 Tinción de Gram



4. MATERIALES PARA LA PRÁCTICA CON HONGOS FILAMENTOSOS

MATERIALES		
INSTRUMENTAL BÁSICO	SOLUCIONES	MATERIALES
<ul style="list-style-type: none">• Láminas• Asa para hongos	<ul style="list-style-type: none">• Azul de Lactofenol	<ul style="list-style-type: none">• Cultivo de Hongos

Tinción con Azul de Lactofenol



BIBLIOGRAFÍA

- Azul de Metileno.
<http://hjaladanamarcos.bravepages.com/unidades/Unidad1A/clasific.htm>, recuperado 10 de diciembre 2005.
- Bancroft J.D. & Gamble M. (2008) Theory and practice of histological techniques. 6th ed. Churchill Livingstone. ISBN: 9780443102790
- Forbes, B.A.; Sahm, D.F.; Weissfeld, A.S. & Trevino, E. (1998). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 10th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.
- Kavanagh K. (2007) New insights in Medical Mycology. Springer. ISBN 9781402063978
- Madigan, M.; Martinko, J. & Parker, J. (1998). Biología Celular. Horobin R.W., Kiernan J.A., Conn H.J. (2002). Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine. 10th ed. Oxford: BIOS Scientific Publisher. ISBN: 1859960995
- Montuega Badía L., Esteban Ruíz FJ. Calvo González A (2009) Técnicas en Histología y biología celular. Elsevier-Masson, Barcelona, Madrid. En: Biología de los Microorganismos. 8va edición. (pp. 56 – 57).
- Murray, P.R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M.A. (2006). Microbiología médica 5a.ed. Elsevier, Washington, D.C.
- Ochei J. & Kolhatkar A. (2000). Medical Laboratory Science. TaTa McGraw Hill, New Delhi.
- SpotTest™ Lactophenol Cotton Blue Stain, Difco Laboratories, Detroit.
http://dentistry.ouhsc.edu/intranet-web/Courses/DMI_8351/Lactophenol.html. Recuperado 10 de diciembre 2005.
- Tinción de Giemsa Accustain®
http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_es_gs10.pdf. Recuperado 10 de diciembre 2010.
- Vodopich, D.S. & Moore R. (2002). Biology Laboratory Manual, 6th edition, McGraw-Hill, Boston, 569pp.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA PARA ESTA PRÁCTICA

La bibliografía mencionada anteriormente y en esta sección puede hallarla en la biblioteca y en las bases de datos de ciencias y tecnología de la misma. Recuerde que usted es libre de llevar otros textos, adicionales a la bibliografía recomendada, que le permitan responder las preguntas del informe. No olvide que es OBLIGATORIO llevar libros de consulta al laboratorio.

- Principios generales de microbiología.
Autor: Palleroni, Norberto J.
Datos de ubicación: Biblioteca general. 576 P166P
<http://biblioteca.uniandes.edu.co/uhtbin/cgisirsi/QKi6FKCd0C/GENERAL/19200007/19/576.+P166P/GENERAL|NO|DEWEY>
- Título: Microbiología. (Biology of microorganisms)
Autor: Brock, Thomas D.
Datos de ubicación: Biblioteca general 576.1B651

<http://biblioteca.uniandes.edu.co/uhtbin/cgisirsi/QKi6FKCd0C/GENERAL/19200007/19/576.+P166P/GENERAL|NO|DEWEY>

- Titulo: Microbiología Zinsser.
Autor: Joklik, Wolfgang K.
Datos de ubicación: Biblioteca general 616.01 J544
<http://biblioteca.uniandes.edu.co/uhtbin/cgisirsi/QKi6FKCd0C/GENERAL/19200007/19/576.+P166P/GENERAL|NO|DEWEY>
- Titulo: Microbiología
Autor: Pelczar, Michael J.
Datos de ubicación: Biblioteca general 576.1 P241
<http://biblioteca.uniandes.edu.co/uhtbin/cgisirsi/QPSgFSfPPN/GENERAL/19200007/18/X650/XSUBJECT/Microbiolog%EDa>
- Titulo: Tratado de microbiología de Burrows
Autor: Freeman, Bob A.
Datos de ubicación: Biblioteca general 576.1 F622