



Programa de la asignatura:

Técnicas de laboratorio de biología

U4

Uso de colorantes y reactivos en el
procesamiento de muestras



DCSBA



BIOTECNOLOGÍA



Índice

Presentación de la unidad.....	2
Propósitos de la unidad.....	3
Competencia específica	4
4.1. Tipos de colorantes y reactivos.....	4
4.1.1. Colorante	6
4.1.2. Método de coloración	10
4.2. Obtención de muestras de células animales y de microorganismos.....	14
4.2.1. Colorantes para células animales	38
4.2.2. Colorantes para microorganismos	44
4.3. Obtención de muestras de tejidos vegetales	48
4.3.1. Colorantes para tejidos vegetales.....	55
4.4. Obtención de biomoléculas.....	59
4.4.1. Tipos de biomoléculas.....	60
4.4.2. Identificación de biomoléculas en el laboratorio	67
4.4.3. Uso de reactivos y colorantes en la obtención de biomoléculas	67
Actividades	70
Autorreflexiones	70
Cierre de la unidad	71
Para saber más	72
Fuentes de consulta	73



Presentación de la unidad

En esta unidad conocerás una serie de procesos que se deben llevar a cabo para la toma de muestras y su posterior análisis, puesto que es muy diferente obtener muestras de organismos vivos y de muertos, provenientes de cualquiera de los tres dominios de la vida. También estudiarás a las biomoléculas involucradas en la vida y los factores abióticos de un ecosistema.

La toma de muestra es el punto de partida para llevar a cabo cualquier tipo de investigación, ya que, si desde un principio no se realizó de acuerdo a los protocolos o técnicas establecidas, la continuidad no proporcionará resultados confiables y no se podrán realizar las aplicaciones pertinentes. Para eso se debe contar con las herramientas adecuadas para la obtención directa o indirecta del organismo a investigar, ya sea libre, en campo o en cautiverio.

Por ejemplo, no es lo mismo tomar una muestra sanguínea de un felino en cautiverio, que trabajar con un animal que esté en una reserva natural. En el primer caso solo se debe de contar con el material para la extracción de muestra, mientras que, en el otro, es necesaria la colocación de una serie de trampas para capturar y tener disponible al espécimen.

De igual forma, si se desea conocer la forma en que un químico afecta al embrión de un mamífero o un ave durante el periodo de gestación, se necesita monitorear el ciclo de gestación de la especie durante el transcurso del experimento, para obtener la muestra después del nacimiento.



Figura 1. Obtención de la muestra.

Tomado de <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=834>
<http://www.elmundo.es/elmundo/2010/09/09/ciencia/1284033573.html>



No hay que olvidar que después de obtener la muestra hay que procesarla. Cuando es pequeña y no es posible visualizarla, se le tienen que aplicar colorantes naturales o sintéticos y reactivos que tiñen o activan algunos de sus componentes estructurales para que sean visualizados al microscopio con mayor precisión.

Propósitos de la unidad



El propósito de esta unidad es describir la metodología para la obtención y procesamiento de muestras de diferentes orígenes, para realizar las actividades, experimentos, investigaciones y trabajos dentro de un laboratorio de biología.



Competencia específica



Describir la forma correcta de obtención de las muestras biológicas, la aplicación de colorantes y reactivos para definir su utilización y aplicación como métodos intermedios en los procesos de análisis, identificación y experimentación en el campo de la Biotecnología.

4.1. Tipos de colorantes y reactivos

Las muestras provenientes de organismos vivos o muertos se obtienen, procesan y manipulan de diversas maneras, según procedan de alguno de los tres dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*); se trate de moléculas (como proteínas, aminoácidos, carbohidratos y vitaminas) y componentes abióticos de un ecosistema como agua, suelo, aire, temperatura, presión, entre otros.

Durante este proceso se utilizan varios insumos (instrumentos, aparatos, sustancias, reactivos) y el tiempo involucrado es de vital importancia, ya sea que se lleve a cabo dentro del laboratorio o fuera de él, puede tardar desde segundos, minutos o días, hasta meses o años (Gaviño de la T. G., Juárez, L. C. y Figueroa, T. H. H., 1999).

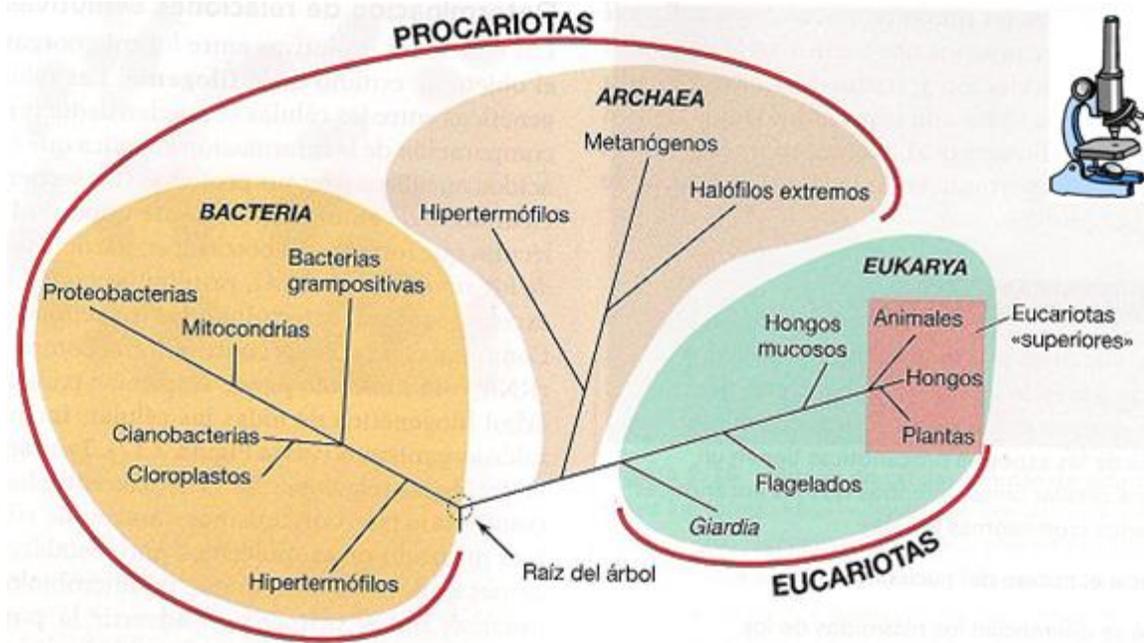


Figura 2. Microscopio y su enfoque de estudio.

Tomado de <http://www.educar.org/inventos/elmicroscopio.asp> y Madigan, et al. (2009) pág. 42

Al realizar una investigación las muestras deben cumplir con ciertas características. Por ejemplo, en algunos casos, para que puedan visualizarse en el microscopio sus estructuras externas o internas se necesita la aplicación de colorantes o reactivos.

Un **colorante** es aquel que sirve para teñir o colorear la muestra que se va a observar al microscopio, sin importar de qué tipo de aparato que se trate. Existen de dos tipos de colorantes: **naturales** y **artificiales**.



Figura 3. Colorantes.

Tomado de <http://centromediconaturae.com/node/9>
http://www.arquisaguatemala.com/catalogo.php?cat_id=4



Por otro lado, un **reactivo** es una sustancia o compuesto químico, líquido o sólido, que va a reaccionar con otro o con la muestra para que pueda ser visible al microscopio.

Por caso, para que se determine si una bacteria es Gram positiva o Gram negativa, se requiere teñir la muestra bacteriana (frotis) con el colorante violeta de genciana, someterla a la acción mordiente de lugol y lavarla con alcohol puro (96%) hasta eliminar el exceso de violeta de genciana. Posteriormente se tiñe con un colorante de contraste, como la fucsina básica o safranina. Las bacterias que retienen la violeta de genciana se llaman Gram positivas (Gram +) y las que se decoloran y se tiñen en rojo por el colorante de contraste son Gram negativa (Gram -).



Figura 4. Reactivos.

Tomado de <http://www.uv.es/gammm/Subsitio%20Operaciones/2%20REACTIVOS.htm>

Los reactivos también sirven para procesar directamente muestras, sin aplicación de algún colorante que desencadene una reacción. Un ejemplo se da al realizar una disección, lo primero que se tiene que hacer es anestesiarse al animal, para lo cual se ocupa formol, formaldehído o éter.

4.1.1. Colorante

Los **colorantes** son considerados compuestos orgánicos y se les denomina también como tintes o pigmentos. Los hay de dos tipos:

- **Naturales:** Son aquellos que están contenidos en los animales (principalmente insectos o invertebrados) y en las plantas (el color rojo del jitomate; el naranja de las zanahorias o las naranjas; el amarillo del mango; el morado del betabel; o el verde de las hojas).
- **Artificiales o sintéticos:** Se obtienen mediante una serie de procesos químicos.



Figura 5. Colorante natural rojo obtenido de *Bixa orellana* L. y colorantes artificiales en dulces.

Tomado de http://medicinarum.plantaemundi.com/2010_08_01_archive.html y <http://zaragozaciudad.net/biosalud/2011/marzo.php>

En la Tabla 1 se enuncian los componentes orgánicos o metabolitos que elaboran las plantas. Dichos elementos son los que les dan la propiedad del color:

Tabla 1. Pigmentos producidos por las plantas

Componente orgánico	Pigmento	Ejemplos representativos
Carotenoides	Amarillo, naranja, rojo	Zanahoria, jitomate
Flavonoides	Amarillo	Naranja, noni, borraja
Antocianinas	Azul, rojo, violeta, púrpura	Arándanos, cerezas, uvas
Porfirinas	Verde	En hojas y frutos
Clorofilas	Verde	En hojas
Betalainas	Rojo y amarillo	Remolacha, tuna, amaranto
Taninos	Café	Café, sauco, té, cacao

Existe gran variedad de colorantes que se han obtenido de manera artificial mediante la ingeniería genética y sus trabajos en la síntesis química de metabolitos de algunos invertebrados. El uso de estos es común, por ejemplo, en la industria alimenticia, al aplicarlos a carnes, frutas, verduras, enlatados, dulces, refrescos, embutidos; en la industria textilera, en el color de la ropa; en el área farmacéutica, en las cápsulas y



jarabes; el rubro automotriz lo utiliza para plásticos, vidrio, cuero, cosméticos, recubrimientos, etcétera.

Colorear una muestra implica teñir ciertos componentes para su posterior visualización al microscopio. Se trata de un proceso sencillo, en la cotidianidad lo encontramos cuando las mujeres se pintan el cabello de otro tono. O cuando se decolora una prenda y se opta por teñirla con el mismo color o con otro diferente. También te habrás dado cuenta de la gran variedad de tinturas en los alimentos como refrescos, dulces, carnes, jaleas, gelatinas; algunos incluso te dejan la boca coloreada, ¿qué poder tienen para causar ese efecto?

Las tinciones se clasifican de la siguiente manera:

- **Tinción simple:** Utiliza solo un tipo de colorante.
- **Tinción diferencial:** Útil para identificar diferentes tipos bacterianos o estructuras externas de las membranas de las células.
- **Tinción específica:** Tiñe en especial estructuras de la célula como flagelos, esporas, cápsulas, estomas, cilios.
- **Tinción fluorescente:** Sirve para marcar con fluorocromos muestras donde los componentes moleculares evidencian la presencia del ADN, anticuerpos, que están fijados o anclados en las células procariotas o eucariotas.
- **Tinción directa:** El colorante interacciona directamente con el sustrato.
- **Tinción indirecta:** Colorante que se mezcla con un mordiente.

Existe una gran variedad de técnicas de coloración y colorantes. A continuación se expone su clasificación, de acuerdo a las propiedades químicas que tienen respecto a la afinidad con las muestras celulares o moleculares que van a teñir:

- **Colorantes catiónicos:** Son aquellos cargados positivamente y que reaccionan con las estructuras celulares cargadas negativamente (como los ácidos nucleicos o los polisacáridos ácidos). En este tipo de colorantes destacan la safranina, el azul de metileno y el cristal violeta.
- **Colorantes aniónicos:** Están cargados negativamente y reaccionan con las estructuras celulares positivas (como las proteínas). Destacan el rojo Congo, eosina y fucsina ácida.
- **Colorantes liposolubles:** Aquellos que se combinan con el material lipídico de las células. Por ejemplo, el negro Sudán, que tiñe a los lípidos de marrón a rojo.

En la Tabla 2 se describen algunos colorantes que les confieren la tonalidad a las muestras de estructuras celulares o moleculares:



Tabla 2. Colorantes muy utilizados en el laboratorio

Colorante	Color
Azul de bromotimol	Azul
Verde de bromocresol	Verde
Rojo de clorofenol	Rojo
Rojo fenol	Rojo
Tartrazina	Amarillo
Azorrubina	Frambuesa
Azul V	Celeste, verde, índigo
Azul Nilo	Azul
Rojo de metilo	Rojo
Naranja de acridina	Naranja
Violeta de genciana	Violeta
Tinta china	Negro
Fenoltaleína	Depende del pH, ácido-incoloro y básico rosa-violeta
Aceite de parafina	Transparente a blanca
Carmín	Rojo
Bismarck brown	Café
Azul brillante	Azul
Bromuro de etidio	Fluorescente rojo-naranja
Nigrosina	Negro
Hematoxilina	Morado, azul, violeta
Lugol	Violeta oscuro
Azul de metileno	Azul
Cristal violeta	Violeta
Safranina	Rojo, rosa
Eosina	Rojo, rosa
Orceína	Fucsia y morado
Fucsina ácida	Rojo, rosa
Rojo Congo	Rojo
Negro Sudán	Negro



4.1.2. Método de coloración

Las muestras que se van a teñir, por lo general, deben ser pequeñas, de una o unas cuantas células para que el colorante se pueda fijar adecuadamente.

Para ello, al órgano o tejido se le aplica parafina, una gota de agua o un frotis sanguíneo y se hacen cortes delgados, con ayuda de un micrótopo o ultramicrótopo. Los tajos se colocan sobre un vidrio de reloj, una tapa de caja Petri o un portaobjetos limpio o estéril y se procede a añadirles el o los colorantes requeridos para la investigación. La tinción dependerá de lo que se requiera observar, por ejemplo, algunas partes estructurales de la célula o moléculas.

Posteriormente, la muestra teñida se deja secar al aire, o se pasa varias veces por la zona azul de una flama, hasta que el vidrio esté tan caliente que moleste al tacto pero no queme. De esta forma se evita su contaminación. Por finalizar, se lava, o se le aplica otro colorante, y se observa al microscopio.

Antes de enunciar la metodología para llevar a cabo las tinciones, se describirán algunos conceptos importantes que debes tomar en cuenta:



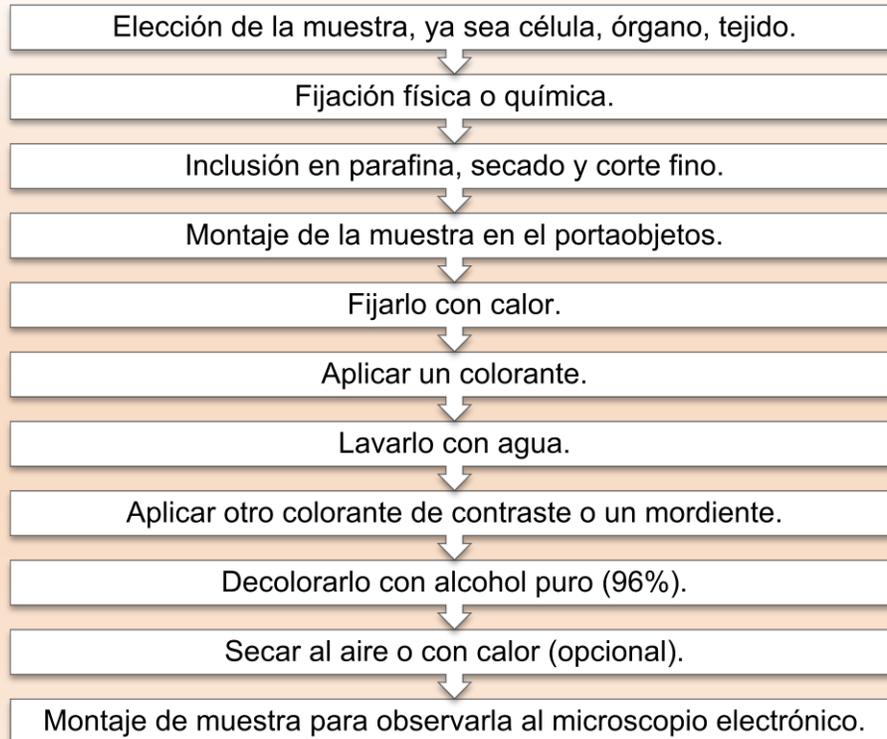
Conceptos sobre tintaciones

- **Fijación:** permite matar, alterar o adherir la muestra para que acepte la tinción. Hay fijadores químicos como etanol, metanol, ácido pícrico y el formaldehído.
- **Inclusión:** incrementa la estabilidad y resistencia de la muestra. Generalmente se hace en parafina líquida, que se deja secar para después realizar cortes histológicos finos con ayuda de un micrótomo.
- **Permeabilización:** consiste en agregar un surfactante que disuelve la membrana celular, haciendo que las moléculas del colorante penetren al interior de la célula.
- **Montaje:** es adherir las muestras a un portaobjetos para observarlas al microscopio. Este proceso aumenta su resistencia mecánica para soportar el proceso de teñido, de tal forma que la estructura quede de acuerdo a la muestra original tomada.
- **Tintación o inmersión:** es colocar la muestra dentro de la suspensión de colorante.
- **Aclarado:** Serie de lavados, generalmente con agua o etanol, para eliminar el exceso de colorante.
- **Mordiente:** mezcla química que reacciona con el colorante y forma un precipitado coloreado soluble que al lavarse o aclararse no se elimina. Ejemplos de mordiente: lugol, aluminio, ácido tánico, alumbre, entre otros.



El proceso de tinción requiere llevar a cabo los siguientes pasos:

Pasos del proceso de tintación



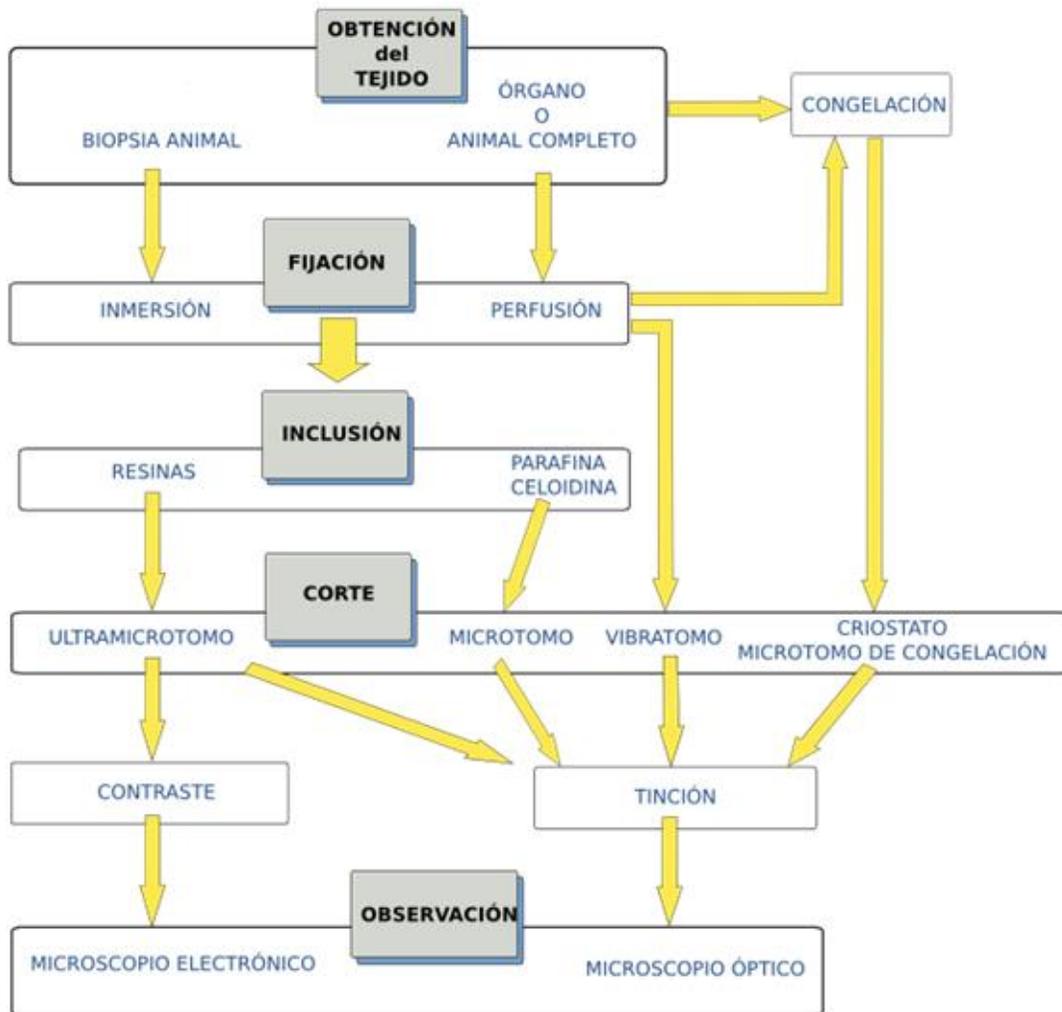


Figura 6. Proceso de tinción.

Tomado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-proceso.php>

Un procedimiento que permite ahorrar tiempo con las muestras teñidas es montarlas en placas y sumergirlas en bálsamos y resinas, así quedarán fijas y conservadas para futuras observaciones (las resinas sintéticas, el xilol y el esmalte de uñas son buenos conservadores).

Para ello, basta pasar una brocha sobre la muestra, dejarla secar y colocarla en un recipiente, evitando que se humedezca o se caliente, porque eso provocaría la pérdida de sus propiedades.



4.2. Obtención de muestras de células animales y de microorganismos

Para llevar a cabo una investigación, de cualquier índole, es necesario realizar la toma de muestra, lo cual resulta muy diferente si se está trabajando con organismos vivos, muertos o inertes; a su vez la muestra puede ser visible a tus ojos (**macroscópica**) o tan diminuta (**microscópica**).

Por ejemplo, para elaborar un antídoto contra el veneno de una víbora, lo primero que hay que hacer es poner trampas para capturar la especie del reptil requerido. Una vez hecho esto, se procede con la ordeña o extracción de la toxina de su veneno, y se desarrolla el análisis de su estructura química para obtener el antídoto.

O bien, si se desea elaborar sintéticamente un medicamento, que originalmente es obtenido de los metabolitos que producen ciertos microorganismos, hay que cultivarlos en el laboratorio para obtener su agente activo y analizarlo químicamente, realizando una serie de experimentos hasta alcanzar el objetivo.

Estos casos dejan ver lo vital que es la planeación del tiempo, tanto en la obtención de la muestra como para evitar que esta se altere, puesto que va a ser utilizada en investigaciones con aplicación biotecnológica.

Las muestras se trabajan en una mesa de laboratorio o, cuando se tienen que procesar inmediatamente después de su obtención, se acondiciona un lugar. Hay que tomar las precauciones adecuadas para el procesamiento de los organismos: es necesario usar bata, guantes, cubrir boca, y seguir la metodología paso a paso para evitar que los resultados no sean los esperados.

Al finalizar la manipulación de los organismos se deben recoger y desechar los residuos y sobrantes en los recipientes destinados según su tipo. Hay que limpiar la mesa con una solución de cloro para sanitizar el lugar y evitar contaminar otras aéreas. Si se trabajó con animales grandes, sus restos se depositan en una charola especial para incinerarlos.

Primero hay que localizar el **hábitat** donde suele encontrarse el objeto de estudio, en condiciones **naturales**, o bien dentro de sistemas **artificiales**; también se tiene que identificar su **ciclo de vida** para aplicar la metodología adecuada. Las muestras pueden ser **virus**, **procariontas** (como arqueas y bacterias), así como **eucariotas** (protistas, hongos, plantas y animales) (Campbell, A. N., Mitchell, G. L. y Reece, B. J., 2001 y Solomon, et al. 2008).]

Después de que se ha llevado la elección de la muestra, es necesario seguir ciertos protocolos para obtenerla (como utilizar determinados aparatos y sustancias químicas para procesarla y canalizarla). En este orden de ideas, hay que tener en cuenta los siguientes conceptos:



Conceptos sobre elección de muestras

- **Cebos:** Fungen como carnada o mecanismo de atracción para organismos vivos, uno de los principales es la comida que generalmente se coloca sobre o dentro de una trampa, cerca de donde habita el organismo
- **Trampas:** Algunas de las más utilizadas son jaulas de metal o madera, así como redes. Para sostenerlos o transportarlos se usan peceras, ganchos herpetológicos, guantes, cuerdas, costales.
- **Anestésicos:** Se debe planear su empleo, ya que algunos actúan como anestésicos **generales** (aquellos que disminuyen la actividad del sistema nervioso central causando falta de movimiento, hipnosis, somnolencia, pérdida de conciencia y sensibilidad) y otros como **locales** (solo resulta afectada una parte del cuerpo, la de interés).

En el empleo de estas sustancias se debe tomar en cuenta el tipo, la edad, el peso y talla del organismo; ya que una práctica mal empleada puede resultar contraproducente. Algunos anestésicos químicos (como el formol, formaldehído, morfina, cocaína, lidocaína, éter) se aplican directamente. En ocasiones se hace uso de equipos, como rifles o pistolas, que disparan dardos somníferos o inyecciones para adormecerlos.

- **Disección y corte:** Proceso mediante el cual se va a dividir el cuerpo de un organismo para estudiarlo a profundidad. Por ejemplo, la separación de la piel, órganos y tejidos, mediante la utilización del estuche de disección.
- **Aspiración:** Para remover líquidos o sustancias (como sangre, orina, jugo gástrico, plasma) provenientes del interior del cuerpo del organismo. Se succionan con una pipeta, jeringa o una manguera, para su posterior análisis.
- **Raspado:** En ciertas ocasiones solo se necesita un exudado o raspado de cierta parte del organismo para estudiarlo a fondo, lo cual se hace con ayuda de una espátula, cuchara o un hisopo.

Las muestras de organismos o microorganismos pueden ser **procariotas** (sus células carecen de un núcleo delimitado por una membrana nuclear y de otros organelos),



pudiendo ser arqueas y bacterias o de **eucariotas** (su célula tiene un núcleo delimitado por una membrana nuclear y otros organelos con membranas, pertenecientes al dominio *Eukarya*) como algas, protozoos, hongos, hongos mucosos, plantas y animales. Debe considerarse que las muestras eucariotas están constituidas por pequeñas moléculas organizadas, que conforman a los organelos dando origen a las **células**, que en conjunto forman **tejidos**, estos a su vez **órganos** y ellos van a formar los **aparatos** y **sistemas**.

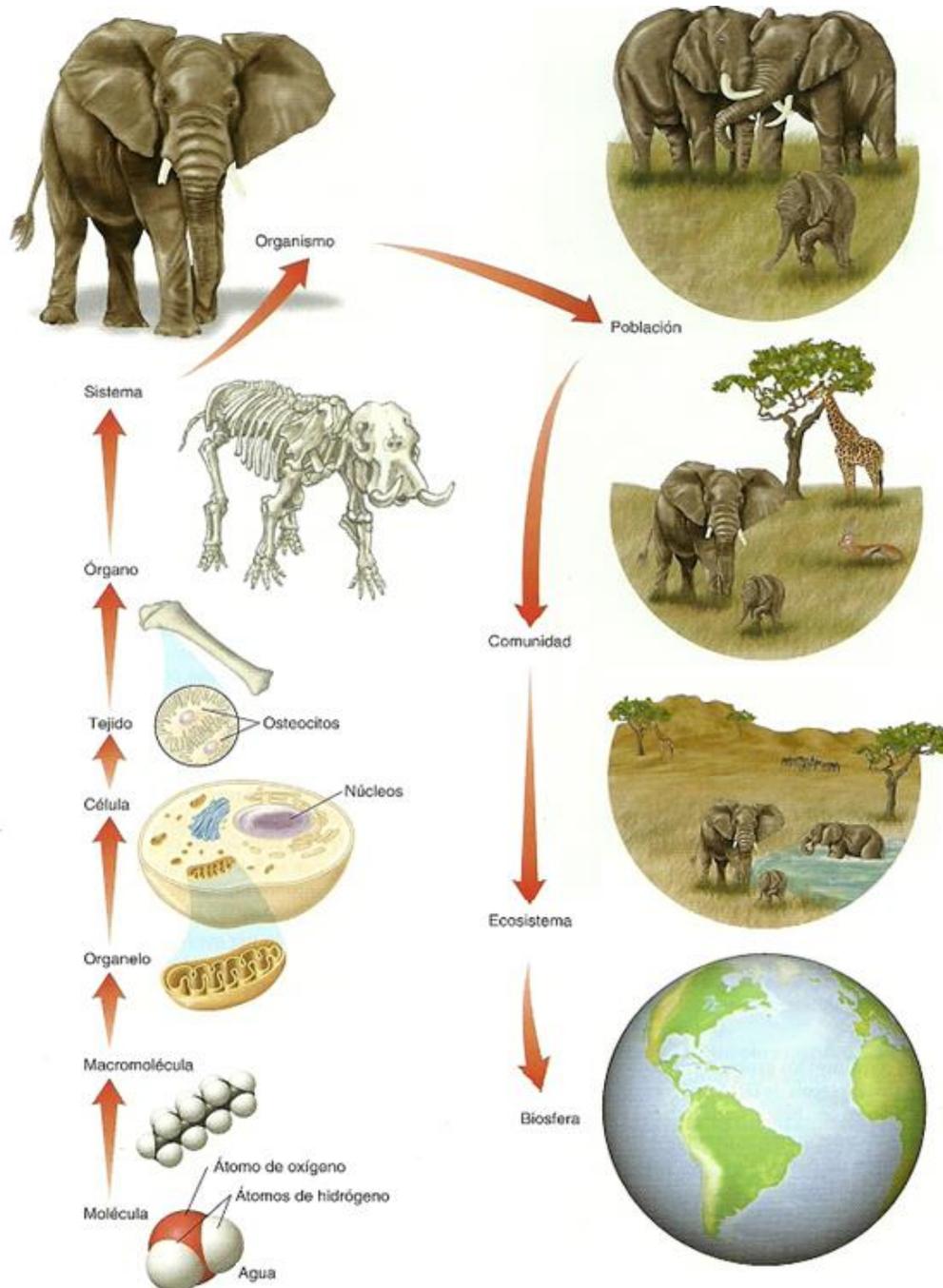


Figura 7. Organización jerárquica de la vida.
Tomado de Solomon, et al. (2008)



Aunque existen otro tipo de microorganismos que no están considerados dentro de los procariotas y eucariotas, estos son los virus, así que debes ser cuidadoso al momento de obtener la muestra de interés, pues los **virus** son los causantes de muchas de las enfermedades infecciosas, ya que genéticamente pueden contener ADN o ARN rodeado por una cápsula proteica. Su reproducción se lleva mediante la replicación de su material genético cuando infectan a cualquier tipo de células huésped (como arqueas, bacterias, protistas, hongos, plantas y animales), las lisa o promueve su división.

Los virus no son células, no tienen capacidad metabólica propia, carecen de ribosomas y no sintetizan sus proteínas. Su tamaño parte desde los 10 nm. Pueden estar extra o intracelular (Madigan, *et al.* 2009).

Hay que extremar precauciones en la toma de muestra de un organismo que se presume está infectado de algún virus, ya que en ocasiones pueden causar la muerte. Trabajar con ellos es similar a como se realiza con las bacterias: se cultiva el microorganismo y se analiza su estructura proteica y genómica, para determinar su poder patógeno y obtener así medicamentos y vacunas eficaces en contra de la enfermedad.

Algunos virus de gran importancia son el del ébola, VIH, rabia, papiloma humano, gripe, viruela, sarampión, mosaico del tabaco, así como aquellos que atacan bacterias, denominados bacteriófagos.

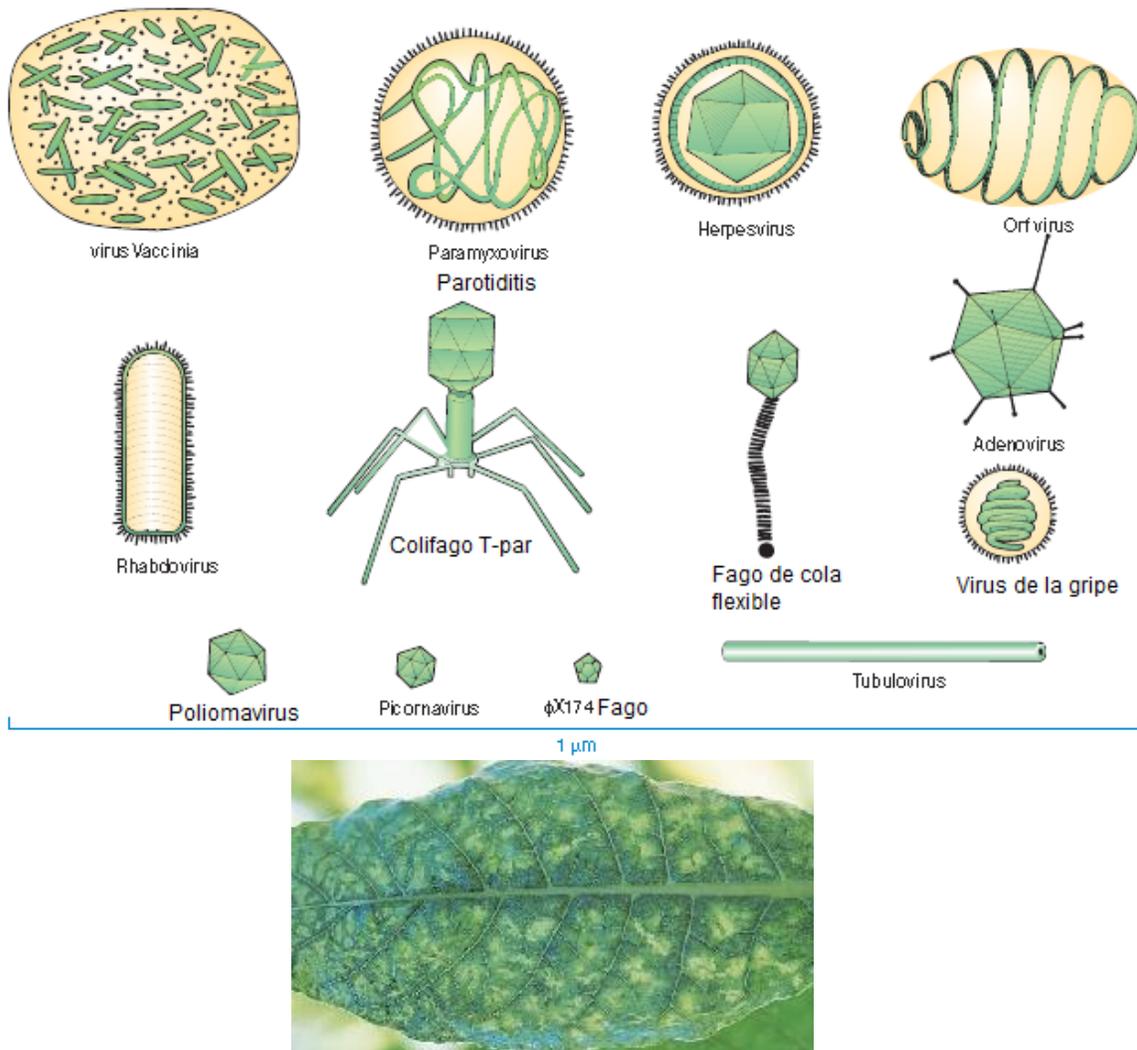


Figura 8. Tipos de virus y virus del mosaico del tabaco sobre *Nicotiana glutinosa*.
Tomado de Prescott, et al. (2000) pág.352 y 356

Se describen a continuación los organismos pertenecientes a los tres grandes Dominios (Bacteria, Arquea, y Eucaria):

- Dominio Archaea:** Fueron los primeros microorganismos que se establecieron en la Tierra (bacterias antiguas), son procariontes. Están divididas en el **Filum Euryarchaeota** y el **Filum Crenarchaeota**. El primero comprende organismos como *Thermococcus* y *Pyrococcus*, arqueas hipertermófilas y *Methanopyrus*, arquea metanógena



En el otro *filum* se encuentran arqueas hipertermófilas en temperaturas altas (geiser) y bajas (hielo), tales como *Crenarchaeota* que habita en lugares que superan los 80° C (Madigan, *et al.* 2009).

Los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* pueden encontrarse en un cráter apagado, en un pantano, en un lago a punto de secarse, en los glaciares, los geiseros y otros lugares.



Figura 9. Arqueas en el Parque de Yellowstone a) caldera de azufre y b) géiser donde crece la arquea *Sulfolobus*.

Tomado de Prescott, *et al.* (2000) pág.445

- **Dominio Bacteria:** Este tipo de microorganismos son cosmopolitas, habitan en lugares como el agua, suelo, aire, en plantas, animales, en el ser humano, ambientes acidófilos, termófilos, anóxicos, en tuberías, maquinaria industrial, entre otros. Su reproducción es mediante fisión binaria.

Existen alrededor de siete mil 500 especies de bacterianas descritas hasta el momento y se proyecta que hay cerca de un millón más. Imagina cuántas especies faltan por determinar e identificar.

La bacteria *E. coli* originalmente se localiza como flora normal en los intestinos de animales y del humano, sin embargo, en concentraciones altas causa patogenicidad, provocando diarrea aguda y sanguinolenta.



Un caso común se presenta en establecimientos donde se venden alimentos. Supón que a varios clientes de una tortería les provocó infección intestinal (diarrea), esto hace que las autoridades sanitarias tomen cartas en el asunto y clausuren el negocio mientras se hacen los análisis pertinentes. Para ello, se realiza un cultivo de bacterias de todos los alimentos que se preparan ahí, para aislar al microorganismo de la de *E. coli* y saber con certeza qué alimento fue el que desencadenó la infección (Brooks, G. F., Carroll, C. K., Mietzner, a. T., Butel, J. S. y Morse, S. A., 2011).

Otro caso recurrente es el neumococo *Streptococcus pneumoniae*, al igual que la *E. Coli* es parte de la flora de la nariz, garganta y pulmones, pero si se altera su población es causante de neumonía, meningitis o sinusitis. Para obtener una muestra de él, se toma un hisopo y se realiza un exudado laríngeo o faríngeo que se procesa en el laboratorio. Ahí se determina su grado de patogenicidad y, en dado caso, se mejoran las vacunas y medicamentos que existen para contrarrestarlo (Brooks, *et al.* 2011).

El cultivo puro de una especie bacteriana se realiza de la siguiente manera:

Con ayuda de un hisopo se recolecta una muestra del lugar donde se encontró o donde habita normalmente. Posteriormente se siembra en un medio de cultivo bacteriano, con los requerimientos nutricionales requeridos por el microorganismo, y se aísla de una serie de bacterias que se obtienen en una primera siembra. Por último, se resiembra y se le aplica una serie de pruebas bioquímicas para determinar la especie bacteriana requerida y se continua cultivándola en el laboratorio para utilizarla en posteriores análisis biotecnológicos.

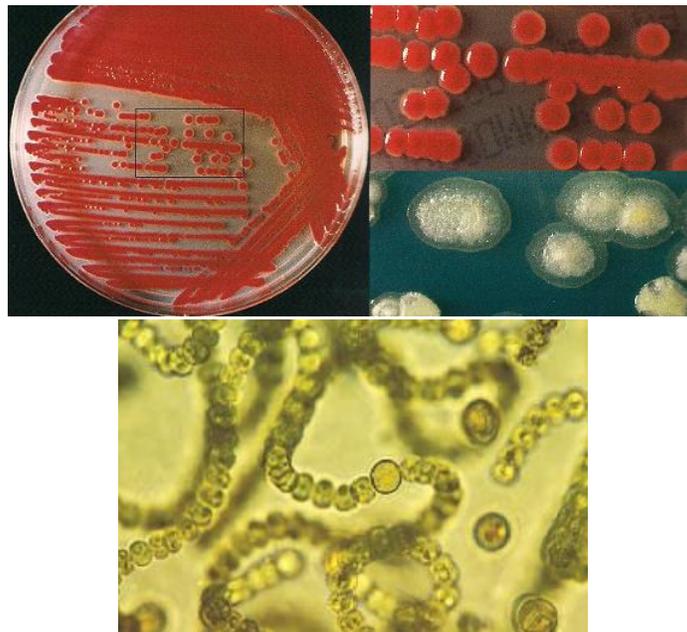


Figura 10. Ejemplos de cultivos bacterianos y Cianobacteria Nostoc.
Tomado de Madigan, et al. (2009) pág. 123 y Prescott, et al. (2000) pág.460



- **Dominio Eukarya:** Este dominio está formado por cuatro reinos, que son **protista fungi, plantae** y **animalia**. En este apartado solo se describirán los integrantes del reino protista (la mayoría son microorganismos), y los reinos fungi y animalia (que contienen especies tanto macroscópicas como microscópicas).

Cabe señalar que la mayoría de estos organismos se reproducen sexualmente, aunque existen otros que lo hacen de manera asexual o son hermafroditas.

a) Reino Protista: en él se localizan organismos eucariotas (algas verdes, rojas, y cafés, diatomeas) que dieron origen a las plantas (protistas vegetaloides); a los hongos mucilaginosos; a los mohos (protistas micoides o falsos hongos), antecesores de los hongos verdaderos, de tipo mucilaginoso, pared celular de celulosa y no de quitina.

También incluye a los **protistas animaloides**, protozoarios que dieron origen a los animales, destacan especies parásitos del humano como la *Amoeba*, *Acanthamoeba*, *Entamoeba*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Paramecium*, *Vorticella*, *Tripanosoma*, *Giardia*. Existen cerca de 50 mil especies y aún falta por identificar y determinar más. Habitan tanto en el agua dulce como en la salada, en el suelo, en lugares húmedos.

Para obtener la muestra se debe tener presente qué investigación se va a realizar. Por ejemplo, en una muestra de agua encharcada vista al microscopio se pueden encontrar especies de Euglenas, Paramecium, Algas y otro tipo de protistas.

Ciertos protistas animaloides habitan en artrópodos, al cual utilizan como vector para transmitir enfermedades cuando pican al hombre o a los animales domésticos. Otros se presentan como parásitos, es el caso de las especies del género *Plasmodium*, causantes de la malaria o paludismo; la *Entamoeba histolytica*, que produce amebiasis intestinal; las diferentes especies de *Leishmania* que generan Leishmaniasis; la *Tripanosoma cruzi*, culpable de la enfermedad de Chagas o enfermedad del sueño; y la *Toxoplasma gondii*, que causa la toxoplasmosis.

Para determinar si un individuo es portador, se toma una muestra de sangre fresca, se visualiza al microscopio para detectar microorganismos móviles, mediante tinción de Giemsa o Wright, y se inocula a un ratón o se hace un xenodiagnóstico que es un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o infección parasitaria transmitida por un vector (generalmente un artrópodo).

La enfermedad de Chagas (o tripanosomiasis americana), por ejemplo, ha provocado miles de muertes en el área tropical de América Latina (México, Ecuador, Venezuela, Brasil, Perú, Argentina entre otros). Es causada por el protozoario flagelado *Tripanosoma cruzi* y su ciclo inicia cuando el vector, una chinche hematófaga del género *Triatoma* (chinche besucona) pica a un humano o a un animal y deja sus heces que penetran en la herida o en las mucosas.

El contagio también puede ocurrir en las transfusiones sanguíneas, trasplantes que involucren a personas infectadas, alimentos infectados por heces o huevecillos o de



manera congénita. En estos casos, el protozoo entra directamente al torrente sanguíneo, donde se multiplica (se divide) e invade a los sistemas nervioso central, al digestivo y al corazón, lo cual provoca fiebre, aumento del tamaño del bazo e hígado, meningoencefalitis, problemas del colon y esófago, cardiomiopatía, demencia y, finalmente, la muerte (Ramos, L. A., Ramírez, S. M. E., González, H. J. C., Rosales, E, J. L. y López, M. A., 2006).

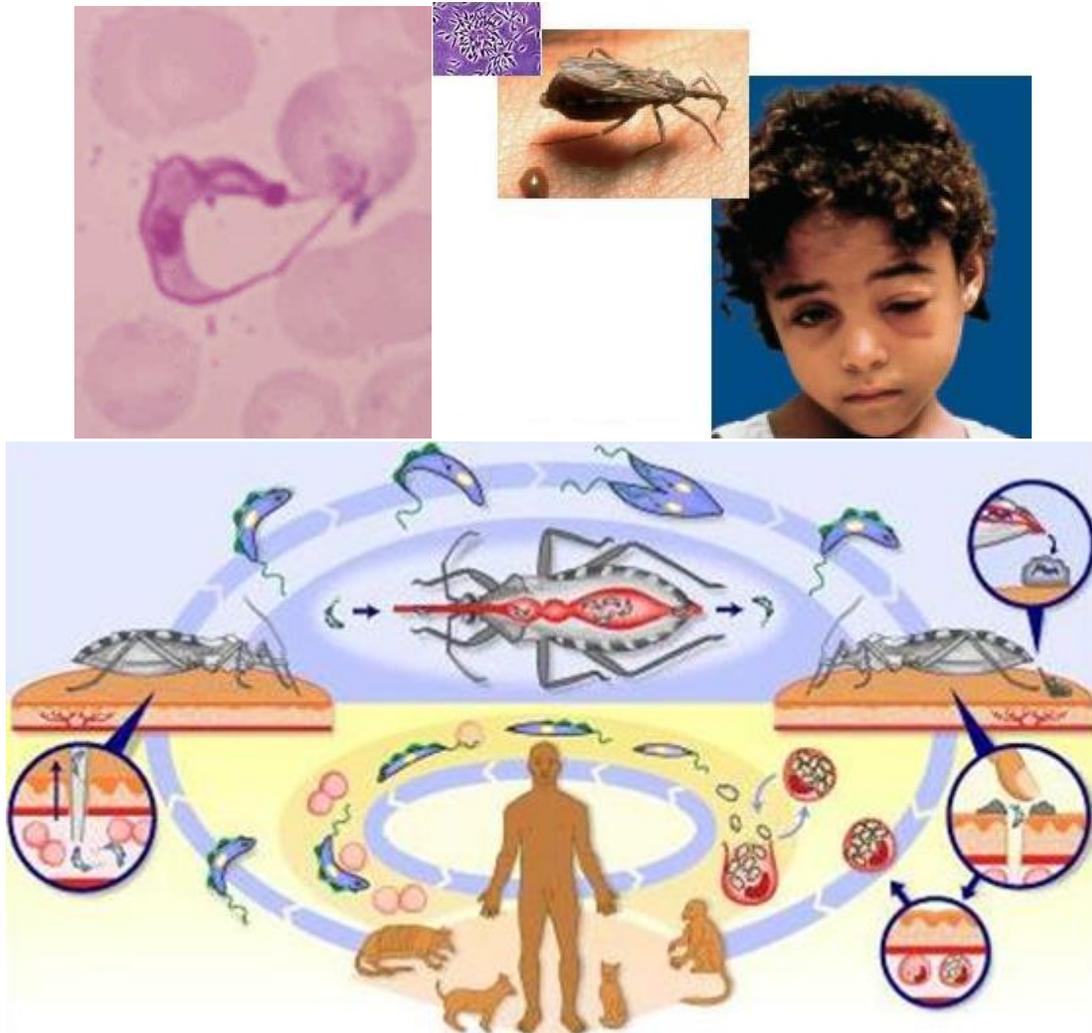


Figura 11. Tripanosomiasis americana efectos y ciclo de vida.

Tomado de <http://www.msgpp.org/chagas.shtml> y <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* es la misma especie que causa la enfermedad del sueño en Europa y Asia, también pertenece al orden que genera la Leishmaniasis. En la actualidad no se ha podido encontrar fármaco o vacuna confiable para su cura, solo existe tratamiento para hacer menos grave la enfermedad.



Esto es un reto para la biotecnología. Algunos experimentos e investigaciones para conocer la fisiología y poder patológico de este protozario revelan que el *T. cruzi* es un microorganismo cuya envoltura celular toma las características de las proteínas que el sistema inmunológico posee para atacar al protozario mediante los anticuerpos.

El *Paramecium spp* es un protista animaloide que en lugar de tener flagelo presenta cilios que recubren toda su superficie, esto le ayuda a evadir los químicos del ambiente que lo rodea. Por la forma de su locomoción y su cantidad de micronúcleos es muy estudiado.

Este microorganismo que habita en estanques de agua dulce o en charcos, ya que son lugares con suficiente materia orgánica, que es su alimento principal. En una gota de agua se pueden visualizar miles de microorganismos como este, además de dinoflagelados, diatomeas y algas verde-rojas-cafés (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

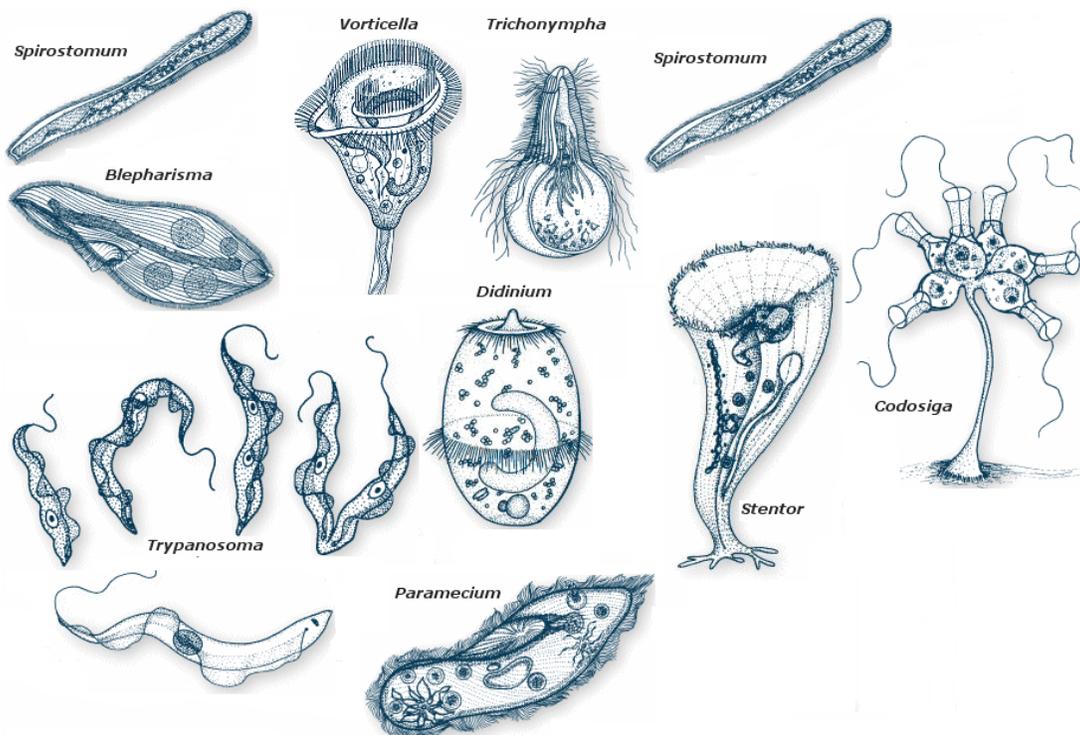


Figura 12. Ejemplos de protistas animaloides.

Tomado de <http://hepatopatiass-microbiologia.blogspot.mx/2009/11/protistas.html>

Por otro lado, los **dinoflagelados** son **protistas vegetaloides** fotosintéticos causantes de la marea roja en las costas. Al aumentar su población se tornan de color naranja-rosado y producen toxinas dañinas que incluso pueden provocar la muerte de peces y humanos.



Las diatomeas son algas unicelulares cuya pared contiene sílice, lo que le da a su estructura un aspecto vidrioso. Morfológicamente están compuestas de dos partes que son similares, y que en algunos casos llegan a encajar una sobre otra. Ellas son las principales responsables de elaborar moléculas orgánicas que sirven de alimento en los ambientes acuáticos (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

Las algas verdes, rojas y cafés presentan una pared de celulosa, tienen dos flagelos que les proporcionan movilidad, no presentan tallos, hojas ni raíces. Las algas cafés están presentes en las costas rocosas y en mar adentro; las rojas se localizan en aguas cálidas, costeras de los trópicos y son parte de la formación de los grandes arrecifes de coral. Finalmente, las algas verdes (como *Chlamydomonas*) habitan en agua dulce y salada, son fuente de alimento para los organismos acuáticos y se consideran como el grupo que dio origen a las plantas (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

Una muestra de agua (de mar, lago, río, charco, piscina o pecera sucia) es útil para visualizar al microscopio miles de microorganismos de este tipo de protozoarios.

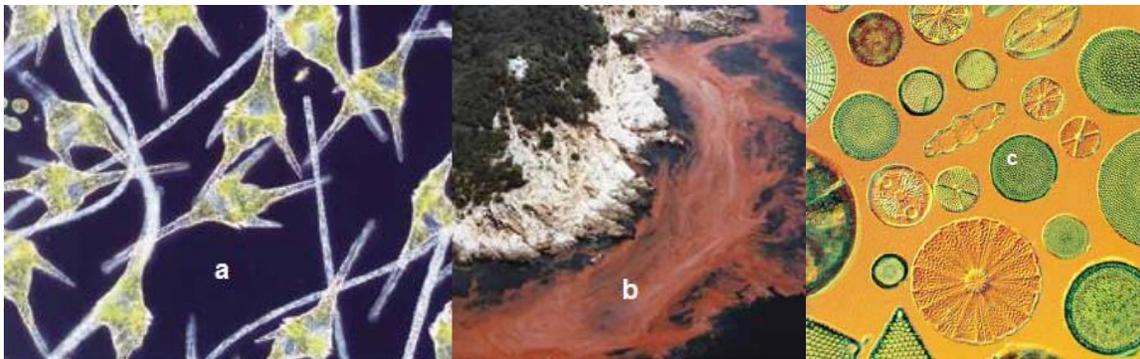


Figura 13. Ejemplos de protistas vegetaloides a) un alga verde, b) dinoflagelados, causantes de la marea roja en el mar y c) diatomeas.
Tomado de Solomon, *et al.* (2008)

Los **protistas micoides o fungoides** son aquellos mohos viscosos que se localizan en materiales en vías de descomposición, como troncos de árboles, por lo que en lugares con mucha humedad se podrán encontrar este tipo de microorganismos degradadores de materia orgánica. Un ejemplo de ellos es el *Dictyostelium*, microorganismo estudiado en cuestiones de mecanismos genéticos y cambios químicos derivados de la diferenciación celular (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

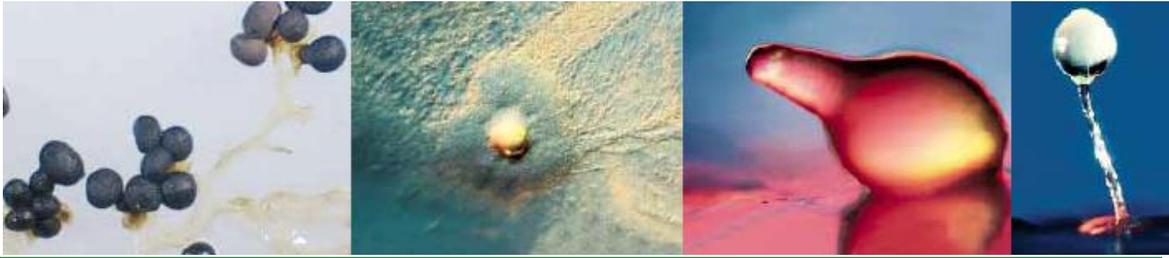


Figura 14. Ejemplos de protistas micoides *Dictyostelium*
Tomado de Solomon, et al. (2008)

b) Reino Fungi: un hongo es una masa de filamentos en forma de red (llamados hifas) que en conjunto forman micelios. Son organismos eucariotas, heterótrofos, inmóviles, con pared celular de quitina, unicelulares (como las levaduras) y multicelulares (como los mohos y las setas, cuerpo fructífero del hongo).

Habitan en todo tipo de ambientes y se conocen unas 100 mil especies, divididas en grupos de mutualistas, degradadores y el resto son parásitos que dañan a plantas y animales. Dentro de este reino se encuentran los mohos, las levaduras y los hongos (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).



Figura 15. Hongos
Tomado de Solomon, et al. (2008)

Te habrás percatado que, tras unos días sin refrigerar pan, tortillas o comida, se les forma una masa algodonosa en la superficie, la cual suele llamarse moho. Esto se debe a que al



existir condiciones óptimas de temperatura y humedad, los mohos crecen al alimentarse de la materia orgánica que está en descomposición. Esta sería una forma sencilla de obtener muestras de dichos organismos.

Como suele realizarse con las bacterias, las levaduras pueden ser aisladas y cultivadas de acuerdo a los requerimientos nutricionales. Algunas son muy importantes, ya que se ocupan en la elaboración de pasteles, pan, cerveza, vino y quesos.

Los hongos, por su parte, pueden ser de tipo parásito, como los que infectan a las plantas, causando pestes agrícolas de gran repercusión económica, ya que afectan cosechas de granos como el trigo, maíz, café, arroz, avena. Otros afectan a los animales, incluyendo al hombre, causando trastornos como la tiña o el contagioso pie de atleta, que ataca a la dermis (piel), en especial la de los pies, causando comezón, ardor y aparición de ampollas.

Existe otro uso que se da a los hongos actualmente: como comestible. Aquí se incluyen las setas, trufas y champiñones; también están los alucinógenos y tóxicos como *Amanita muscaria*, y los *Psilocibes spp*, especies que son medicinales y pertenecen a los géneros *Pleurotus*, *Agaricus*, *Penicillium*, *Ganoderma*.



Figura 16. Importancia de los hongos (hongos, levaduras y líquenes).
Tomado de Solomon, et al. (2008)

c) Reino Animalia: consta aproximadamente de 1.5 millones de especies, divididas en más de 30 Filas (Filum). De algunos solo existen vestigios fósiles, en otros se pueden encontrar especies tanto microscópicas como macroscópicas. Por ello, para obtener muestras, y según la finalidad de la investigación, hay que tomar en cuenta el tipo de hábitat donde se puede.

Con información de Campbell *et al.* (2001) y Solomon *et al.* (2008), la Tabla 3 presenta algunos Filum del reino animalia (invertebrados y vertebrados) y sus características más sobresalientes:



Tabla 3. Filum animalia y sus características.

Filum	Características
Porifera	Organismos como esponjas, la mayoría habita en agua dulce, también las hay de agua salada como <i>Scypha spp.</i>
Cnidaria	Se localizan especies de corales, medusas, actinias, anémonas, hidras, entre otras.
Ctenophora	Se parecen a los integrantes del Filum Cnidaria, de vida libre, peines y nueces de mar.
Mesozoa	Organismos en forma de gusano, generalmente son parásitos de invertebrados marinos.
Platyhelminthes	Organismos que habitan en agua dulce o salada, gusanos aplanados, algunos son parásitos del hombre o animales, como <i>Taenia spp</i> y <i>Fasciola spp.</i>
Gnathostomulida	Los gusanos microscópicos, viven en las costas, se desplazan sobre la arena, son hermafroditas.
Rhynchocoela	Denominados gusanos cinta, algunos son microscópicos y otros llegan a medir varios metros.
Nematoda	Gusanos acuáticos, terrestres, algunos parásitos de animales y plantas, como <i>Ascaris lumbricoides</i> lombriz intestinal o <i>Wuchereria bancrofti</i> que causa la elefantiasis.
Nematomorpha	Son gusanos parásitos, muy semejantes a los nemátodos, de cuerpo muy delgado.
Acanthocephala	Gusanos parásitos de aves y mamíferos, habitan en especies de artrópodos, su cabeza tiene unos filamentos en forma de espina.
Kinorhyncha	Gusanos microscópicos que habitan en las costas fangosas, la superficie de su cuerpo está cubierta por espinas.
Rotifera	Gusanos planos o esféricos microscópicos, que habitan en lugares húmedos, en agua dulce. Conforman el plancton, especies de los géneros <i>Hydatina</i> , <i>Philodina</i> .
Gastrotricha	Gusanos aplanados y microscópicos.
Loricifera	Organismos microscópicos que habitan en el fondo marino, presentan lorica (esqueleto externo, como una armadura).



Tabla 3. Filum animalia y sus características.

Entoprocta	Similares a los hidrozooos, sésiles o viven en colonias, suelen adherirse a especies bentónicas de invertebrados, algas y plantas.
Mollusca	Especies acuáticas y terrestres de caracoles, babosas, ostras, ostiones, almejas, mejillones, pulpos y calamares.
Sipuncula	Organismos marinos, gusanos no segmentados, denominados gusanos cacahuete.
Priapulida	Gusanos marinos, segmentados, cuerpo en forma de cilindro, por lo general suelen enterrarse, son carnívoros.
Echiura	Organismos con forma de gusano tipo cuchara, algunos son parásitos del sexo opuesto.
Annelida	Especies acuáticas y terrestres como sanguijuelas y lombriz de tierra.
Pogonophora	Son gusanos marinos, asemejan a un tubo, suelen fijarse sedimento marino o adherirse a material en descomposición.
Tradigrada	Conocidos como osos de agua, cosmopolitas, microscópicos, habitan en lugares húmedos, tienen cuatro pares de patas.
Pentastomida	Son parásitos invertebrados, delgados y aplanados, denominados gusanos lengua, parasitan las vías respiratorias de vertebrados.
Onychophora	Organismos invertebrados, de cuerpo blando, asemejan una oruga, ya que poseen muchos pares de patas.
Arthropoda	Phylum más numeroso de todos los seres vivos, especies de crustáceos, arañas, garrapatas, e insectos.
Brachiopoda	Organismos que habitan en la profundidad del mar o viven adheridos a ciertas especies de algas, se asemejan a las almejas, unas cuantas especies sobreviven, las demás son fósiles.
Bryozoa	Organismos microscópicos, sésiles o viven en colonias grandes, adheridos a las piedras, conchas de moluscos, algas, caparazones de crustáceos, habitan generalmente en lagos.
Chaetognata	Gusanos flecha por la forma que tienen, son transparentes, en la cabeza presentan espinas útiles para atrapar a su presa.
Echinodermata	Especies que habitan en el mar como lirios, erizos, pepinos, estrellas, arañas, galletas.
Chordata	Contiene especies pertenecientes a los Subphylum Urochordata, Cephalochordata y Vertebrata



El reino animalia contiene la mayoría de las especies conocidas de seres vivos, por lo que es de carácter importante su estudio hacia aplicaciones biotecnológicas. En el siguiente esquema se ejemplifica cómo fue el origen y evolución del reino animalia, desde el filum Porifera hasta los organismos actuales del filum Chordata. Notarás que los protistas animaloides dieron origen al reino animal.

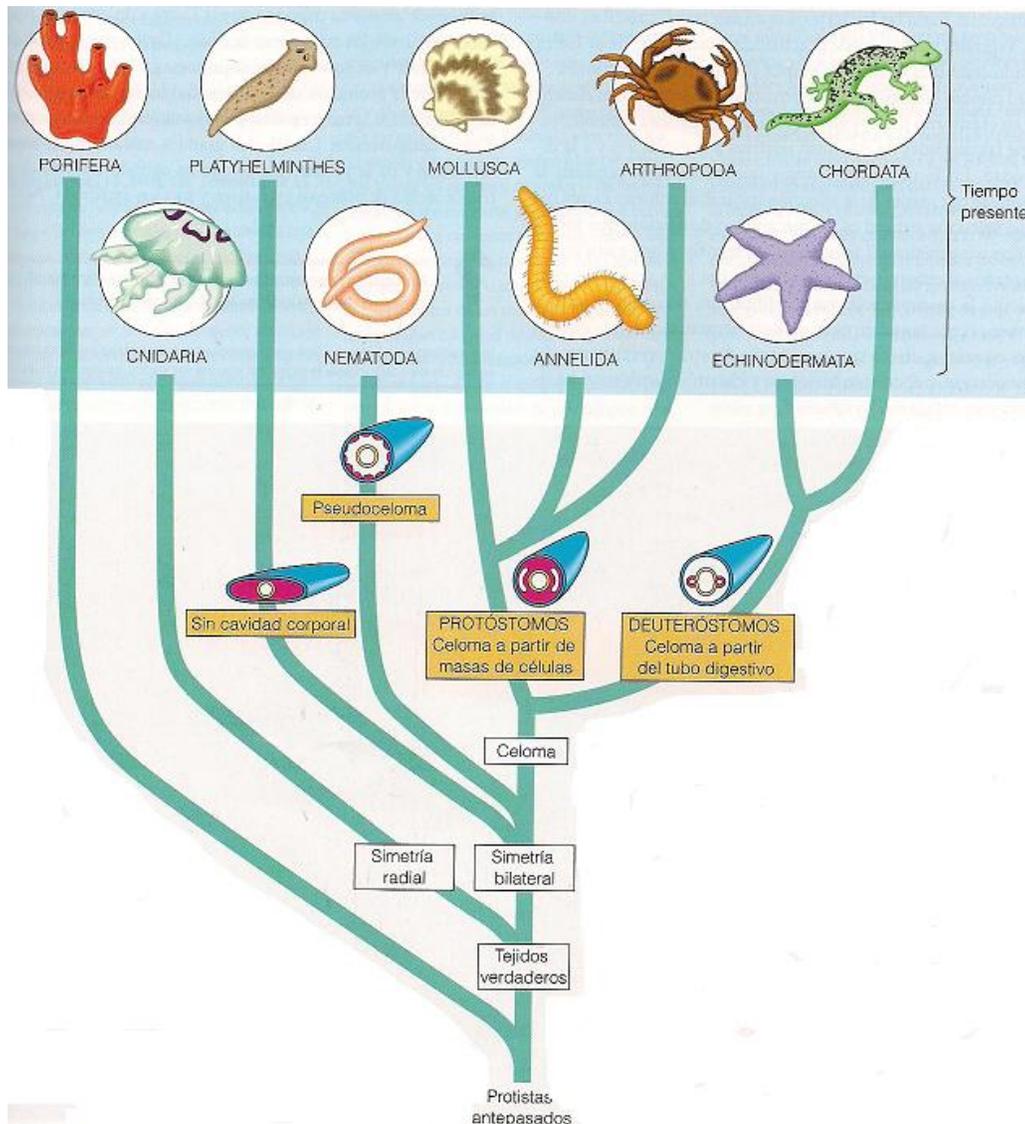


Figura 17. Evolución del Reino Animalia.
Tomado de Campbell, et al. (2001) pág. 393

Las muestras que se pueden obtener de los animales son **órganos** de los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso, reproductor, excretor, digestivo, óseo. **Tejidos**, como el muscular, que contiene células del músculo liso, estriado, y cardiaco; el tejido nervioso,



que contiene a las neuronas y la neuroglia; el tejido epitelial, que puede ser sensorial, de revestimiento o glandular; y, el tejido conectivo, que contiene a las células adiposas, hematopoyéticas, cartilaginosas, óseas, conjuntivas y sanguíneas (Campbell, et al. 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

A continuación, se detallan algunos de los filum por su gran importancia económica, médica, ecológica:

Las esponjas están dentro del **Filum Porifera**, por lo general habitan el lecho marino y fondo de los lagos. Algunas pueden ser pequeñas (como *Scypha* que mide tres centímetros de altura) o existen esponjas de hasta dos metros. Se reconocen porque su cuerpo está cubierto de poros.



Figura 18. *Spinosella plicifera* una esponja.
Tomado de Solomon, et al. (2008)

Los integrantes del **Filum Cnidaria**, anteriormente conocidos como Celenterados, son organismos acuáticos de agua dulce y salada como las hidras, medusas, actinias, anémonas, corales; probablemente habrás visto documentales, películas, series, caricaturas, en donde se distinguen integrantes de este *Phylum*.

Hay que tener mucho cuidado al momento de coleccionar muestras de este tipo de organismos, ya que algunas especies secretan toxinas que causan urticaria e irritación en la piel, o dan ligeros toques eléctricos. Las hidras se pueden coleccionar en estanques y lagos de agua dulce; las medusas se desplazan libremente por el agua marina y hay que tomar precaución porque presentan flecos, como tentáculos; las anémonas y corales habitan también en el fondo marino (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

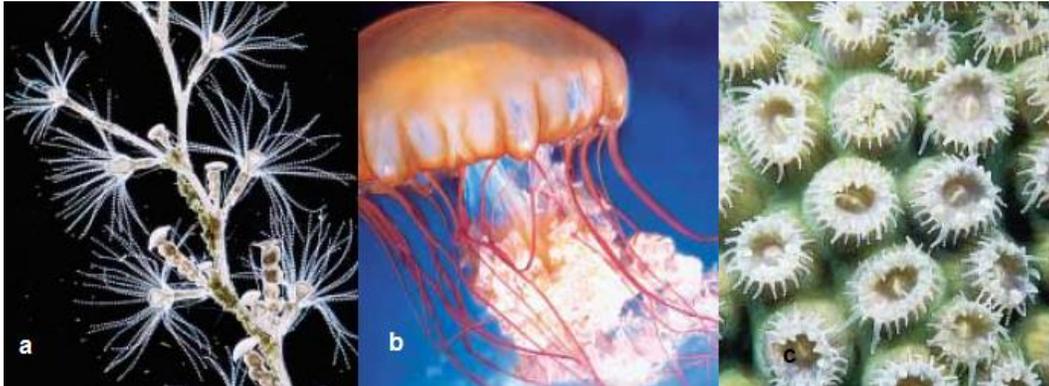


Figura 19. Ejemplos del *Phylum Cnidaria* a) pólipo de hidra *Gonothyrea loveni*, b) medusa *Chrysaora fuscescens* y c) pólipo de coral *Montastrea cavernosa*. Tomado de Solomon, et al. (2008)

Los integrantes del *Filum Platyhelminthes*, denominados gusanos planos, son animales similares a hojas o listones, cuya longitud va desde un milímetro hasta veinte metros.

Se dividen en tres campos característicos:

- i) Planarias: Son un grupo de platelmintos no parásitos denominado gusanos de vida libre.
- ii) Trematodos: Son parásitos conocidos como duelas, causantes de la enfermedad esquistosomiasis, presente en países de África, Sudamérica y sudeste asiático. Este padecimiento afecta a la sangre, provocando dolor abdominal, anemia y disentería grave. *Schistosoma*, *Fasciola hepática* son especies que pertenece a este grupo.
- iii) Céstodos: También llamados acantocéfalos o gusanos listados. Uno de los más conocidos son las tenías. Se trata de parásitos que habitan en el tracto digestivo de los vertebrados (reptiles, aves y mamíferos). Su cuerpo es una cinta larga repetitiva, son hermafroditas y sus huevecillos salen expulsados por el hospedero en las heces. Especies representativas son *Taenia rhynchus*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* (Campbell, et al. 2001 y Solomon, et al. 2008).

Suelen colectarse muestras de platelmintos de organismos parasitados mediante exámenes coproparasitoscópicos, para identificar huevecillos. Estos gusanos colonizan todo el organismo cuando no se diagnostica a tiempo, por lo que se recomienda desparasitar a los niños (huéspedes comunes) dos veces al año, para evitar que entorpezcan su crecimiento, ya que los trematodos y céstodos absorben sus nutrientes, causándole enfermedades y, en ocasiones, la muerte.

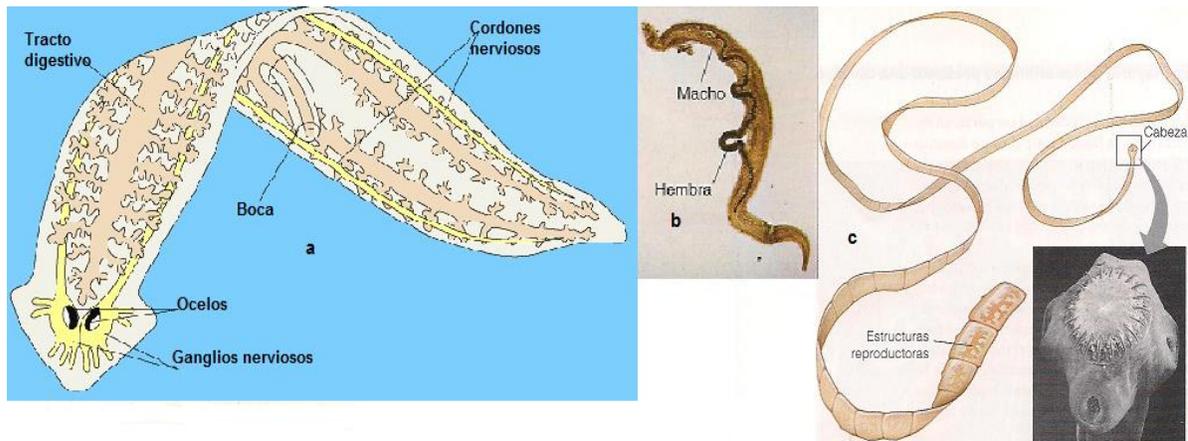


Figura 20. Platelmintos a) planaria, b) trematodo y c) céstodo.
Tomado de Campbell, et al. (2001) pág. 372-373

Los nematodos son conocidos como gusanos redondos y conforman el **Filum Nematoda**. De cuerpo cilíndrico y cola afilada, habitan en cualquier lugar donde haya materia orgánica en descomposición, son considerados degradadores importantes del suelo y el fondo de lagos y océanos; otros son parásitos de plantas y animales. Existen cerca de 90 mil especies.

Caenorhabditis elegans es un gusano de vida libre, es muy estudiada para comprender cómo los genes controlan el desarrollo animal. Los anquilóstomos o lombrices intestinales son nematodos que se adhieren a la pared intestinal y chupan la sangre del huésped.

Trichinella spiralis es un nematodo que causa la triquinosis en mamíferos, incluyendo al humano, los gusanos juveniles están presentes en carne de cerdo mal cocida, se alojan en el músculo, incluyendo el cardíaco, y llegan a causar la muerte cuando existen en gran número en el hospedador. Otros ejemplos de estos son *Ascaris lumbricoides*, la muy conocida lombriz intestinal y *Wuchereria bancrofti*, causante de la elefantiasis (Campbell, et al. 2001 y Solomon, et al. 2008).

Para obtener una muestra de nemátodos, se sujeta un embudo a un soporte universal, en el cuello se le coloca un filtro de algodón y en la parte baja una tapa de caja Petri. Se le vierte una solución de agua y en aproximadamente 48 horas se podrán observar los organismos. Para procesarlos se utiliza una aguja de disección, se pueden mirar directamente al microscopio o se pueden teñir para trabajar con su morfología externa.



Figura 21. Nemátodo acuático alimentándose de un alga.
Tomado de Solomon, et al. (2008)

El **Filum Mollusca** contiene 150 mil especies, tanto terrestres como acuáticas (agua dulce y salada). Se dividen en **gasterópodos** (caracoles y babosas); **bivalvos** (ostras, ostiones, mejillones, almejas); y, **cefalópodos** (pulpos y calamares). Su cuerpo es blando y está protegido por una concha dura.

Para obtener una muestra hay que escudriñar en la arena o el fango del fondo marino, donde suelen habitar. Este es el caso de los gasterópodos y bivalvos, que son sedentarios, aunque algunos solo se posan sobre el lecho marino, en lugar de enterrarse, como algunas ostras. Los cefalópodos se desplazan libremente con gran velocidad y agilidad en mar adentro (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

Estas especies son de gran importancia como eslabón dentro de la cadena alimenticia o cadena trófica, el hombre explota la mayoría comercialmente en el ramo alimenticio, aunque algunos son vectores causantes de enfermedades o parasitan cultivos, como los gasterópodos.

En este caso si un virus o una bacteria ataca a los calamares o almejas, que son codiciados a nivel mundial debido a la gran cantidad de dinero que deja su comercialización, como biotecnólogo el trabajo es estudiar a fondo el problema para dar una solución rápida y factible para evitar que se continúe con la catástrofe.

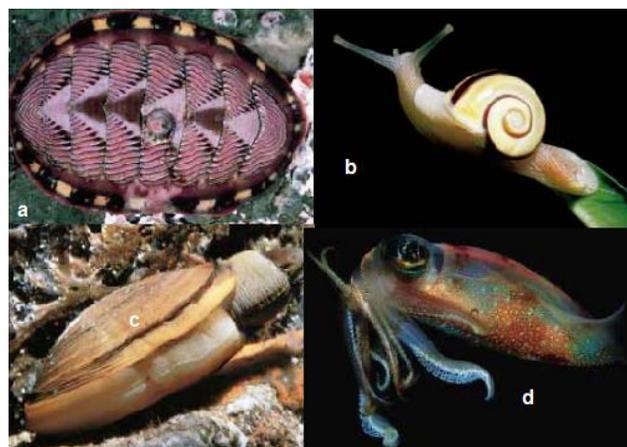


Figura 22. Moluscos: a) *Polyplacophoro* un quitón, b) un caracol es del grupo de Gasterópodo, c) una almeja del grupo de los bivalvos y d) un *Cephalopodo* representado por un calamar.
Tomado de Solomon, et al. (2008)



El **Filum Annelida** comprende a los gusanos segmentados, como la lombriz de Tierra, poliquetos y las sanguijuelas. Su cuerpo está formado por una serie de anillos, de ahí deriva su nombre de filo. Su tamaño va desde un milímetro hasta tres metros de longitud, habitan lugares húmedos o tierras inundadas y son carroñeros. Existen cerca de 15 mil especies, divididas en tres grupos: los **Oligoquetos**, **Poliquetos** e **Hirudineos**.

Las sanguijuelas han sido de gran importancia para los médicos, ya que las utilizan en las sangrías (extracción de sangre mala), he aquí una aplicación biotecnológica para la producción sintética (ingeniería genética) del anticoagulante que la sanguijuela secreta (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).



Figura 23. Ejemplos de anélidos un *Polichaeta*, un *Hirudineo* (sanguijuela) y un *Oligochaeta* (lombriz de tierra).

Tomado de Solomon, *et al.* (2008) y

<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2011/05/31/138374>

Los integrantes del **Filum Arthropoda** conforman a la mayoría de las especies del reino animal, un 70 % aproximadamente. Son cosmopolitas: habitan en el agua, el suelo, el aire, los animales, las plantas y el hombre. Según el tamaño de su población, algunas llegan a convertirse en plagas o parásitos. Su cuerpo está cubierto por un falso esqueleto, denominado exoesqueleto de quitina, del cual mudan y les va dando su dureza característica (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

Los grupos que integran el filum de los artrópodos son: **Subfilum Chelicerata**, especies fósiles trilobites, cangrejo cacerola, arácnidos como alacranes, escorpiones, arañas, ácaros y garrapatas; **Subfilum Crustacea**, acocil, langosta, krill, cangrejo, percebes; y, **Subfilum Uniramia**, como los miriápodos (mil pies y cien pies) e insectos (saltamontes, grillos, abejas, moscos, polillas, mariposas, escarabajos, cucarachas, libélulas) (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

Es importante ubicar el hábitat del organismo a estudiar con aplicación biotecnológica, ysn solo en casa existe una gran cantidad de especies de este filum (como las moscas, moscos, arañas, ácaros). Los artrópodos son de gran importancia como vectores, ya que directamente transmiten enfermedades mediante los virus, bacterias, protistas, helmintos. Especies como moscos, moscas, ácaros, arañas, garrapatas, piojos, chinches, alacranes, escorpiones, son importantes como vectores o por las toxinas que liberan hacia el hospedero.



Un aspecto de tu interés, como futuro biotecnólogo, es estudiar a fondo cada una de estas especies para encontrar una cura para las enfermedades que causan, o bien, erradicar o disminuir la población del artrópodo. No obstante, no hay que olvidar que otros son ecológicamente beneficiosos, como las abejas y avispas, que polinizan las plantas para que estas se puedan reproducir y obtener una serie de especies vegetales cuyo aprovechamiento sea benéfico para la humanidad.



Figura 24. Artrópodos del *Subfilum Chelicerata* a) cangrejo cacerola, b) un acaro y c) araña.

Tomado de Solomon, et al. (2008)



Figura 25. Artrópodos del *Subfilum Crustacea* a) camarón, b) cangrejo, c) krill y d) percebes.

Tomado de Solomon, et al. (2008)

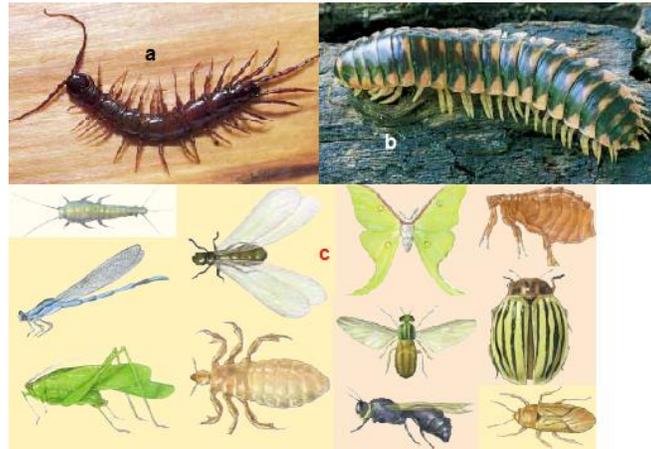


Figura 26. Artrópodos del Subfilum Uniramia a) un centípedo (cienpiés), b) un milípedo (milpiés) y c) varias especies de insectos.

Tomado de Solomon, et al. (2008)

El **Filum Echinodermata** son organismos marinos divididos en cinco Subfilum: **Crinoidea** un lirio de mar, **Asteroidea** una estrella de mar, **Ophiuroidea** arañas de mar, **Echinoidea** una galleta o erizo de mar y **Holothuroidea** un pepino de mar.

Carecen de segmentos, presentan simetría radial, presentan un endoesqueleto (a diferencia de los artrópodos que tienen un exoesqueleto), por lo que al morir dejan una estructura calcárea que se asemeja al esqueleto común de un cordado. Las estrellas de mar presentan una red de pies ambulacrales que tienen poder de regeneración, los cuales les permiten moverse e ingerir su alimento mediante una abertura que hay justo en el centro del organismo (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

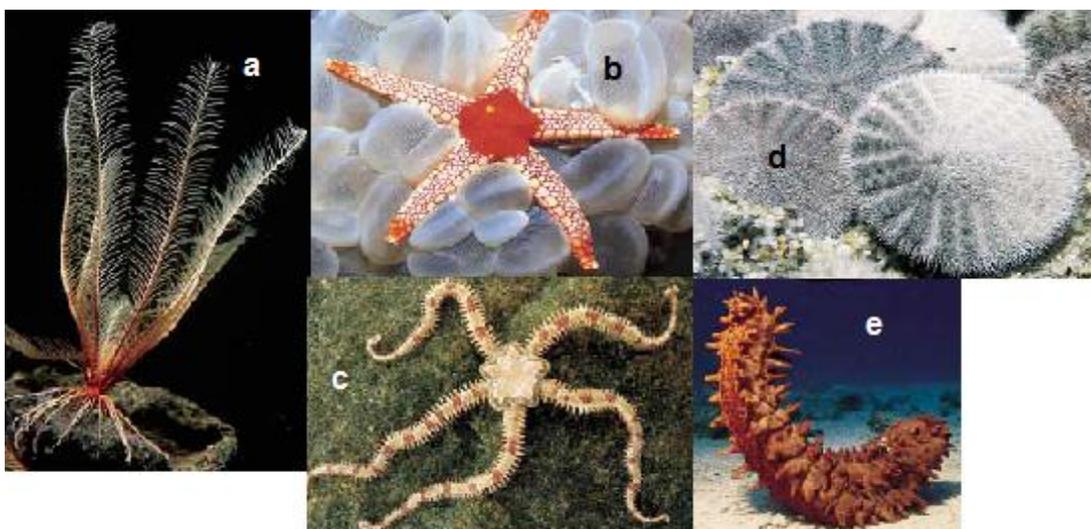


Figura 27. Equinodermos Subfilums: a) Crinoidea un lirio de mar, b) Asteroidea una estrella de mar, c) Ophiuroidea una araña de mar, d) Echinoidea una galleta de mar y e) Holothuroidea un pepino de mar.

Tomado de Solomon. et al. (2008)



Por último, los organismos pertenecientes al **Filum Chordata** presentan un cordón nervioso dorsal y hueco, una notocorda, estructuras branquiales y una cola postanal. Está conformado por tres Subfilum: los **Cephalochordata** (organismos anfibios), **Urochordata** (organismos tunicados) y **Vertebrata** (con columna vertebral verdadera).

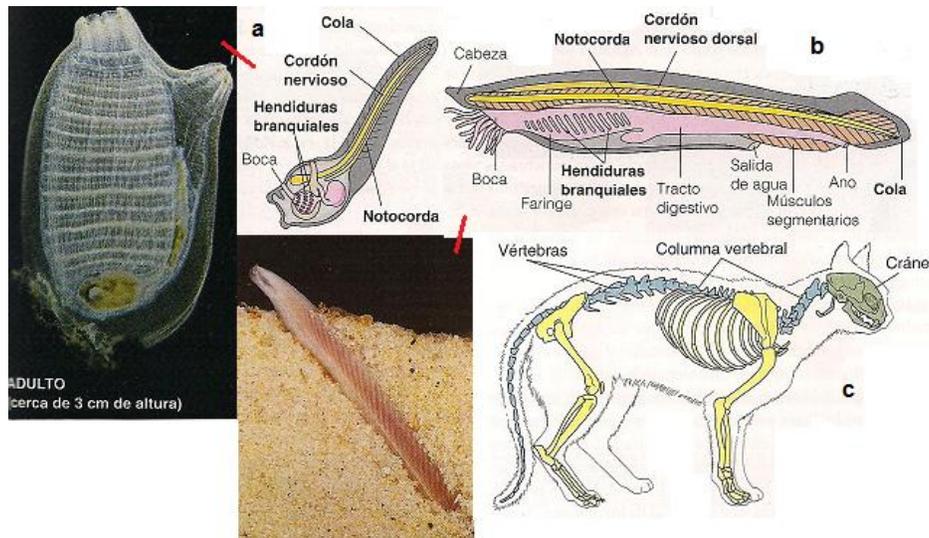


Figura 28. Cordados: a) Subfilum Urochordata, un tunicado, b) Subfilum Cephalochordata, un anfibio y c) Subfilum Vertebrata, un felino.
Tomado de Campbell, et al. (2001) pág. 385 y 386

Dentro de este Subfilum los vertebrados son los más conocidos, como la clase **Agnata** integrada por especies marinas o dulceacuícolas (como lampreas y mixinos); la clase **Chondrichthyes**, que habitan en mar abierto, con esqueleto cartilaginoso (como los tiburones y la mantarayas); la clase **Osteichthyes**, especies marinas o dulceacuícolas con esqueleto óseo; la clase **Amphibia** son semiacuáticos (como ranas, salamandras y cecilias); la clase **Reptilia**, algunos acuáticos y otros terrestres (como las tortugas, víboras, lagartos y tuatara); la clase **Aves** presentan cuerpo cubierto por plumas y algunos vuelan; y, la clase **Mammalia**, con tres subclases: **Prototheria** o **monotremas** (como el ornitorrinco), **Metatheria** o **marsupial** (como el canguro y las zarigüeyas) y los **Eutheria** o **placentarios**, aquellos con desarrollo placentario total, como todos los mamíferos (Campbell, et al. 2001 y Solomon, et al. 2008).



Figura 29. Ejemplos de Vertebrados.
Tomado de Solomon, et al. (2008)



Después de haber colectado o capturado el ejemplar de donde se va a obtener la muestra, esta por lo general se aísla, separando cada uno de los órganos de interés para sumergirlos en parafina líquida (inclusión), donde se deja reposar hasta formar un bloque. Posteriormente se realizarán una serie de cortes finos (pocas micras), con ayuda de un micrótopo o ultramicrótopo, para después montarlos en un portaobjetos, teñirlos y observar en el microscopio los componentes estructurales de interés en las células o biomoléculas que están presentes.

4.2.1. Colorantes para células animales

Partiendo desde lo más complejo, todo ser vivo está constituido por aparatos o sistemas, que contienen varios órganos y estos a su vez están formados por tejidos que, de igual manera, están conformados por miles de células.

Después del proceso de obtención de muestra es muy importante el tipo de colorante que se aplique, pues influye en la observación al microscopio. No todos los colorantes son óptimos para teñir estructuras celulares de origen animal, ya que debido a la estructura química del colorante y de la célula, la reacción que provoca es diferente dependiendo del tiempo de tinción, el tamaño de la muestra, si esta es fresca, así como el proceso de obtención, entre otros (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

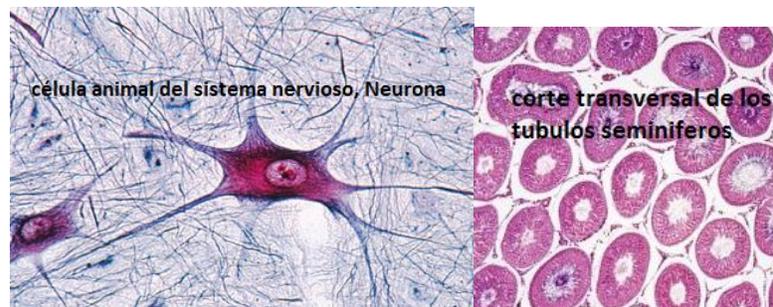


Figura 30. Tipos de células animales.

Tomado de http://www.medical-simulator.com/foto_grande.asp?id=1664&id_producto=1807
<http://www.sciencephoto.com/media/148955/view>

En una célula eucariota resaltan los componentes estructurales: membrana plasmática, aparato de Golgi, lisosomas, centríolo, flagelo (o puede no tener), núcleo, nucléolo, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, retículo endoplásmico liso (REL), retículo endoplásmico rugoso (RER), peroxisomas, mitocondria y citoesqueleto (microtúbulo y microfilamento).

La mayoría de las estructuras celulares son incoloras, por lo que la aplicación de ciertos colorantes hará la visualización de estructuras internas con mucho mayor detalle (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

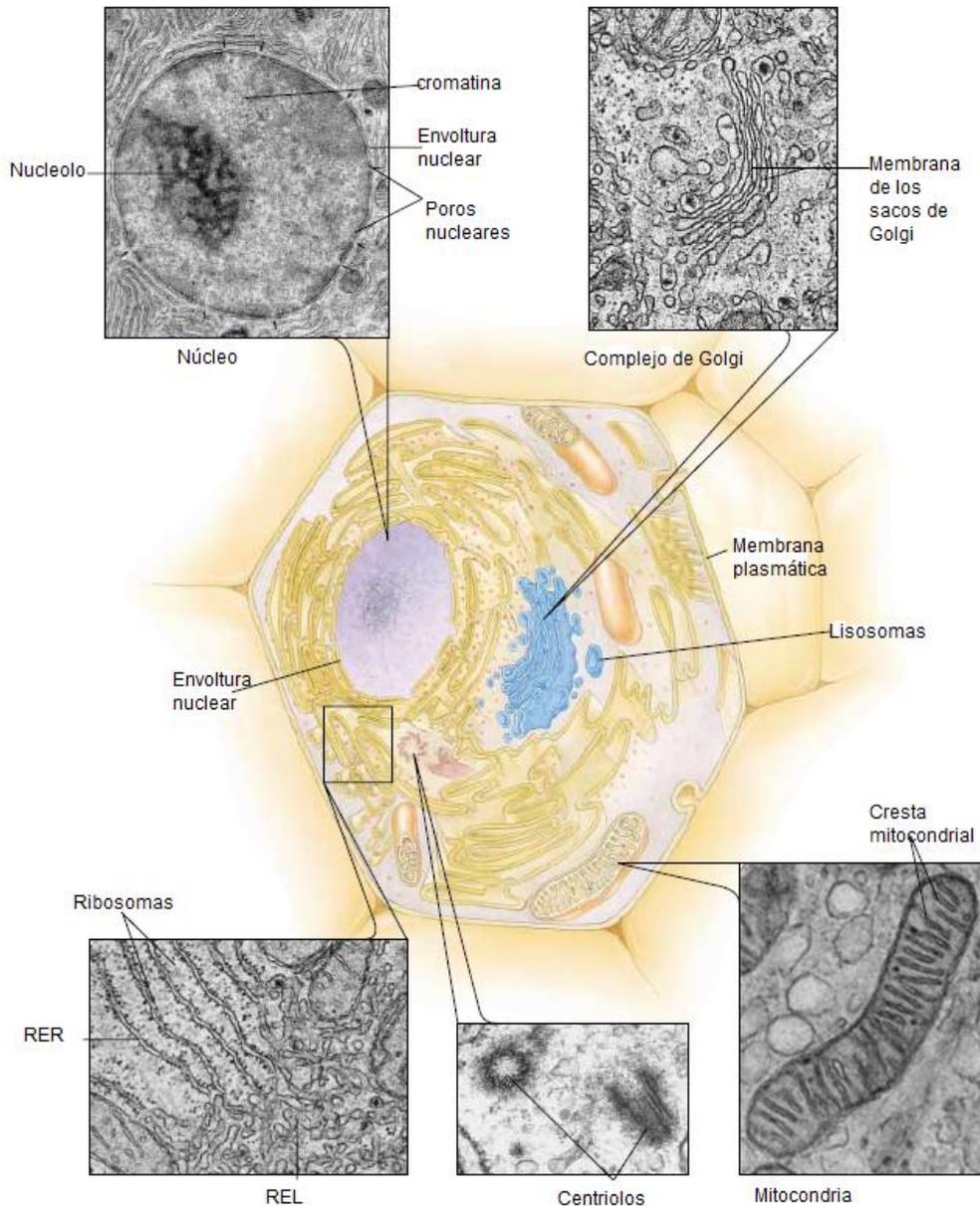


Figura 31. Célula animal.
Tomado de Solomon, et al. (2008) pág. 89

El proceso habitual para teñir una muestra consiste en fijarla de manera física o química, la inclusión en parafina, secar y cortar finamente puede ser opcional. Para montar un frotis se utiliza un portaobjetos nuevo o esterilizado, se limpia la superficie con un algodón impregnado con alcohol puro. Para el frotis de la muestra se hace un barrido o se coloca el corte en la superficie de otro portaobjetos (se puede fijar con calor o dejar secar al aire);



se aplica un colorante en una charola o tina de tinción, se decolora con alcohol, se suministra otro colorante o se lava el exceso con agua, dejando caer los residuos en la tina, se fija finalmente con calor o secado al aire y se monta para observarlo al microscopio electrónico.

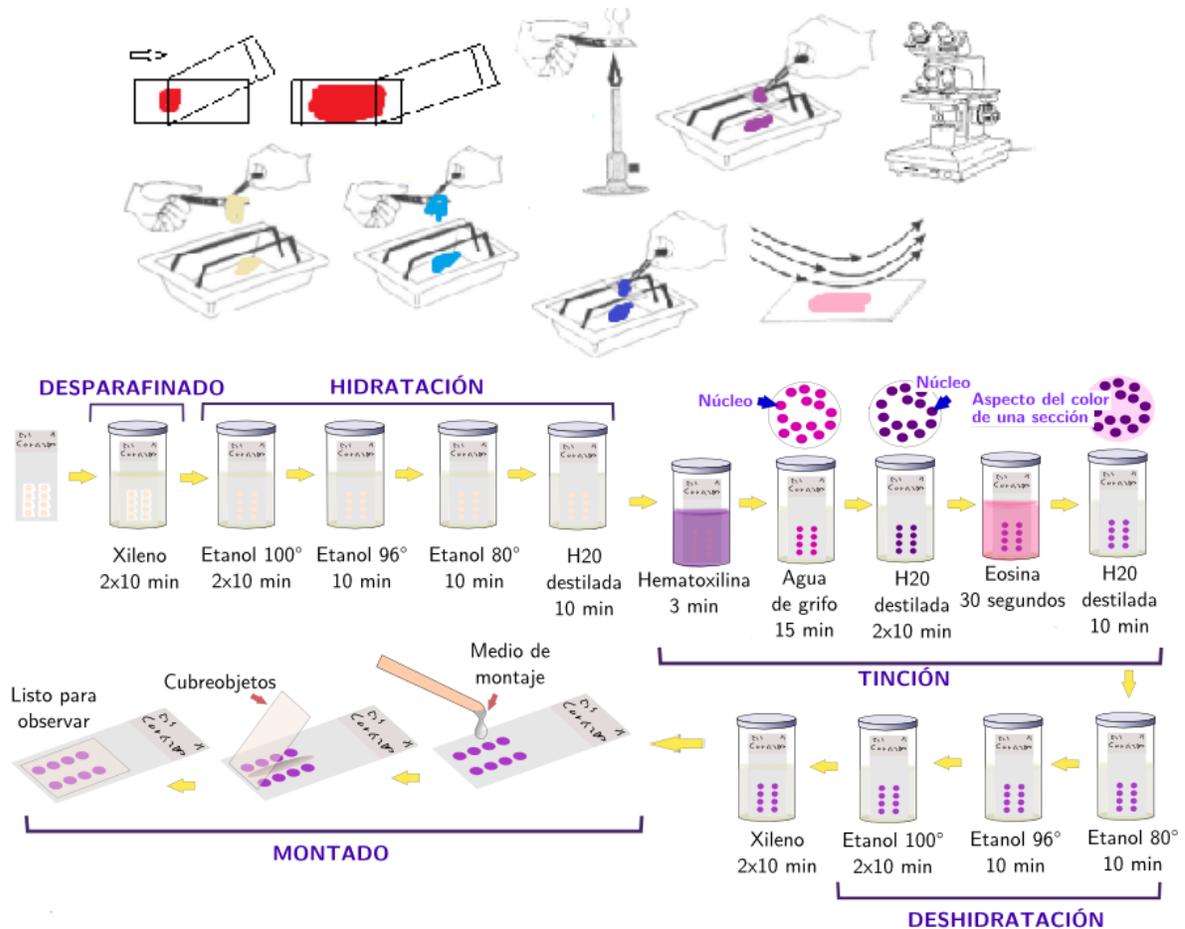


Figura 32. Célula animal.

Tomado de <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm> y <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-general.php>

Hay muestras que no necesitan teñirse, sino que se observan directamente al microscopio (*in vivo*), como es el caso de recuento de espermatozoides en una cámara de Neubauer. La muestra debe ser fresca, no debe tener más de dos horas después de la eyaculación, a temperatura ambiente, se diluye en una solución salina, colocándose unas cuantas gotas sobre la cámara de Neubauer y se observa al microscopio directamente para conocer la morfología, el tamaño y el número total aproximado de células espermáticas por mililitro.

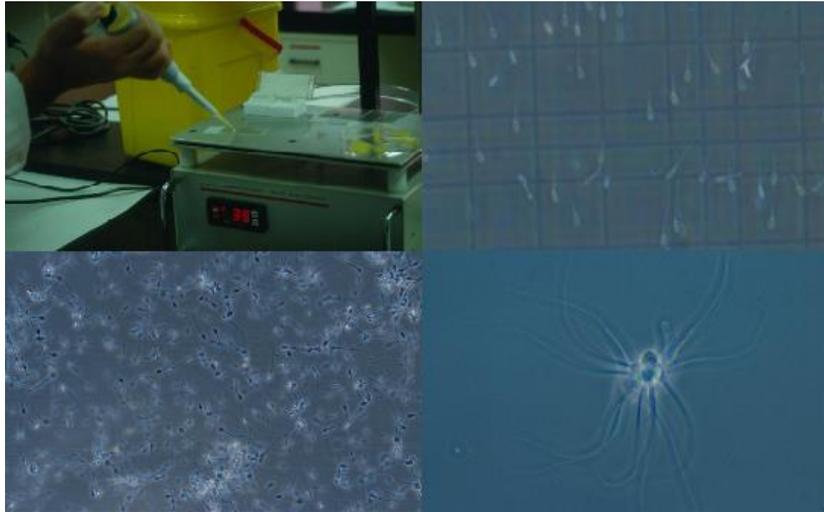


Figura 33. Recuento de espermatozoides, no requiere tinción alguna.
Tomado de <http://www.um.es/grupo-fisiovet/Im-analisis-seminal.htm>

Hay colorantes **naturales** y **artificiales** o **sintéticos**, la mayoría son compuestos orgánicos que van a reaccionar de acuerdo a la carga de los elementos estructurales de la célula. Las siguientes técnicas de tinción y colorantes para células animales están basadas en Barthelemy, (1976), García-Zamudio, (1998), Prescott, et al. (2000), Campbell, et al. (2001), Rodríguez-Cob, (2005), Solomon, et al. (2008) y Brooks, et al. (2011).

Los **colorantes ácidos**, como la **eosina**, tiñen de color rosado a naranja elementos con cargas positivas (como el citoplasma). Por otro lado, los **colorantes básicos**, como la **hematoxilina**, tiñen de color violeta-rosa estructuras con cargas negativas, un ejemplo sería el núcleo y los ácidos nucleicos; aunque también la hematoxilina puede realizarse de forma ácida para teñir de azul mitocondrias y ribosomas. La combinación de **eosina-hematoxilina** sirve para visualizar las células completas.

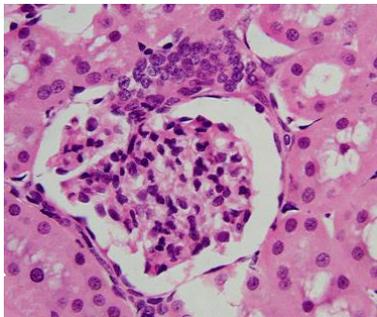


Figura 34. Tinción de eosina-hematoxilina.
La imagen registra un corte histológico de un glomérulo de un riñón de mamífero. Después de la inclusión en parafina, se observan los núcleos de color violeta teñidos con hematoxilina y el citoplasma de color por la acción de la eosina (Alberts, et al. 2002).

Tomado de
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>

El **azul de metileno** es un colorante general que, en células eucariotas muertas, tiñe el núcleo y paredes celulares de la mitocondria o de la propia célula. Es un colorante



metanocromático que dependiendo del pH puede pintar de color púrpura, y no de azul, a los organelos.

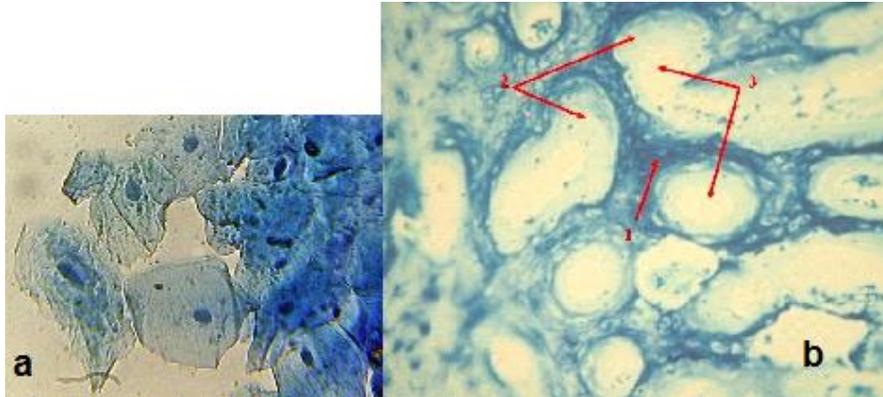


Figura 35. Tinción con azul de metileno.

En la imagen se observa en a) mucosa bucal de a 200 X y b) corte histológico de hueso reticular de pollo de engorda de tres semanas de edad. El 1 es la matriz ósea calcificada (hidroxiapatita ósea), 2 osteoide (matriz ósea no calcificada) y 3 canículos de Havers.

Tomado de <http://biologiagetollon.blogspot.mx/2011/11/practica-de-la-celula-animal.html> y http://www.medvet.umontreal.ca/etudes/enseignementligne/patho_aviaire/aparato_esqueletico/EstructEsqueleNorm_%20StrucSqueNorm/fig22.htm

La tinción de **Giems**a sirve para observar parásitos intracelulares, como protozoarios o bacterias, dentro de una misma célula. Esto se hace evidente al observar frotis sanguíneos o cortes histológicos teñidos con azul de metileno-eosina, aunque también sirve para observar la presencia de ADN dentro del núcleo celular. En los frotis sanguíneos se observan los eritrocitos de color rosa, las plaquetas de color violeta, los neutrófilos tienen núcleo azul-violeta, los gránulos aparecen violeta-rojo y el citoplasma rosa.

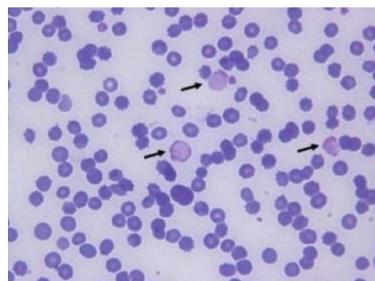


Figura 36. Tinción de Giemsa.

En la imagen se observa células fantasma marcadas con la flecha en un frotis sanguíneo de un felino, derivado de eritrocitos lisados intravascularmente

Tomado de <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7312/ART%C3%8DCULOS/alteraciones-serie-roja.html>



El **carmín** es un colorante natural, muy útil para pintar células y tejidos de sistemas y aparatos como las neuronas, vasos sanguíneos, corteza renal, células del músculo liso, entre otras.

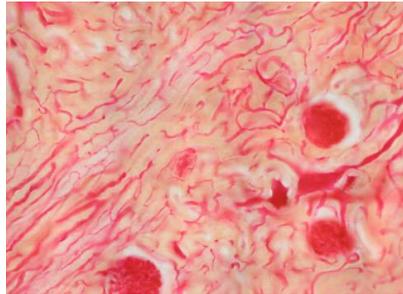


Figura 37. Corteza renal proveniente de un corte de parafina teñido con carmín, las redes son vasos sanguíneos coloreados y las líneas rectas los capilares.

Tomada de

<http://www.wesapiens.org/es/file/2870001/Vascularizaci%C3%B3n+de+la+corteza+renal>

La **orceína** es un colorante natural producto de la asociación de un alga y un hongo que dan como resultado un líquen, que es de donde se extrae. Sirve para entintar fibras elásticas en donde es posible obtener información sobre sus características.

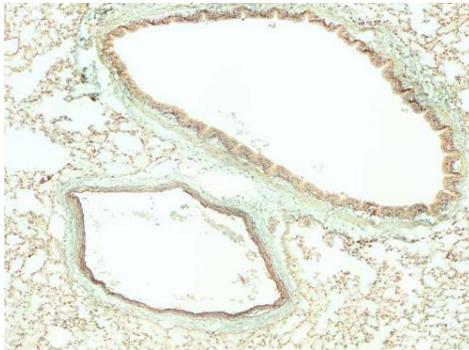


Figura 38. Corte de pulmón de rata teñido con orceína. Se observa en el tejido conjuntivo las fibras elásticas de color marrón, las fibras de colágeno de azul-verde claro.

Tomada de

<http://www.wesapiens.org/es/file/1312171/Pulm%C3%B3n+de+rata%2C+Orce%C3%ADna+7um>

El **azul de toluidina** es un colorante que reacciona en estructuras con $\text{pH} > 7.5$, es decir básicas, como la cromatina dentro del núcleo celular. El color de la muestra que tiñe depende del pH, es útil para trabajar con tejido nervioso.

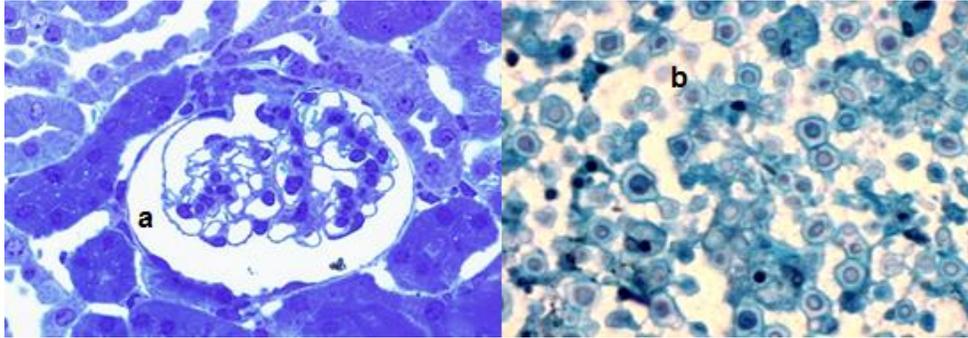


Figura 39. Tinción con azul de toluidina: a) glomérulo de riñón después de una inclusión en resina y b) criptosis ganglionar.

Tomada de <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-general.php> y http://eusalud.uninet.edu/cl_autopsias/Casos/5.02/caso.htm

La **safranina** es un indicador químico que muestra el cambio de color de una sustancia de acuerdo a su pH, se utiliza además como mordiente o contrastante en técnicas histológicas. La afinidad del colorante será de acuerdo a si la muestra presenta cargas positivas o negativas. Por ejemplo, tiñe el núcleo celular de rojo.

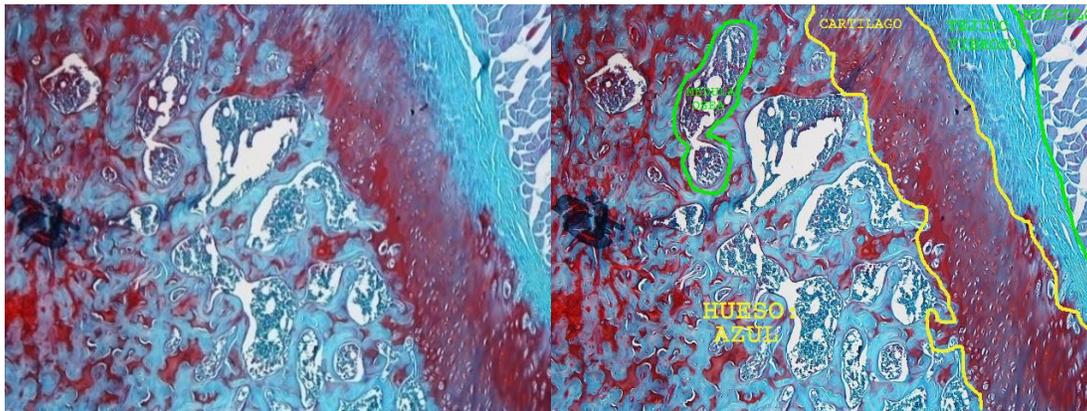


Figura 40. Tinción con safranina.

Tomado de <http://gengibre.ac.uma.es/tic/bioimages/10.andrades-may07/index.html>, <http://gengibre.ac.uma.es/tic/bioimages/10.andrades-may07/femur-y-traquea/hires/06-15145945.jpg>

4.2.2. Colorantes para microorganismos

Hemos visto que los microorganismos son seres vivos tan diminutos que para su estudio es necesario utilizar equipos y una serie de técnicas especiales para conocer sus características.



Una de ellas es identificar a los microorganismos y, como recordarás en el curso de Microbiología y taxonomía microbiana, las pruebas bioquímicas que incluyen a las tinciones se utilizan para identificar y determinar a estos microorganismos, que no necesariamente son bacterias, sino también arqueas, hongos, levaduras, entre otros. A continuación se mencionan algunas técnicas de tinción aplicadas a los microorganismos para estudiarlos, basadas en Prescott, *et al.* (2000), Campbell, *et al.* (2001), Solomon, *et al.* (2008), Madigan, *et al.* (2009) y Brooks, *et al.* (2011).

- Tinción de Gram:** Revela la forma de la célula bacteriana, su agrupación y grupo taxonómico al que pertenece, ya sea Grampositivo o Gramnegativo. Técnica que consiste en teñir la muestra bacteriana (frotis) con violeta de genciana, someterla a la acción mordiente de lugol, lavar con alcohol puro (96%) hasta eliminar el exceso de colorante y teñir luego con un colorante de contraste, como la fucsina básica o safranina. Las bacterias que retienen la violeta de genciana se llaman Gram positivas (Gram +) y las que se decoloran y se tiñen en rojo por el colorante de contraste son Gram negativa (Gram -).

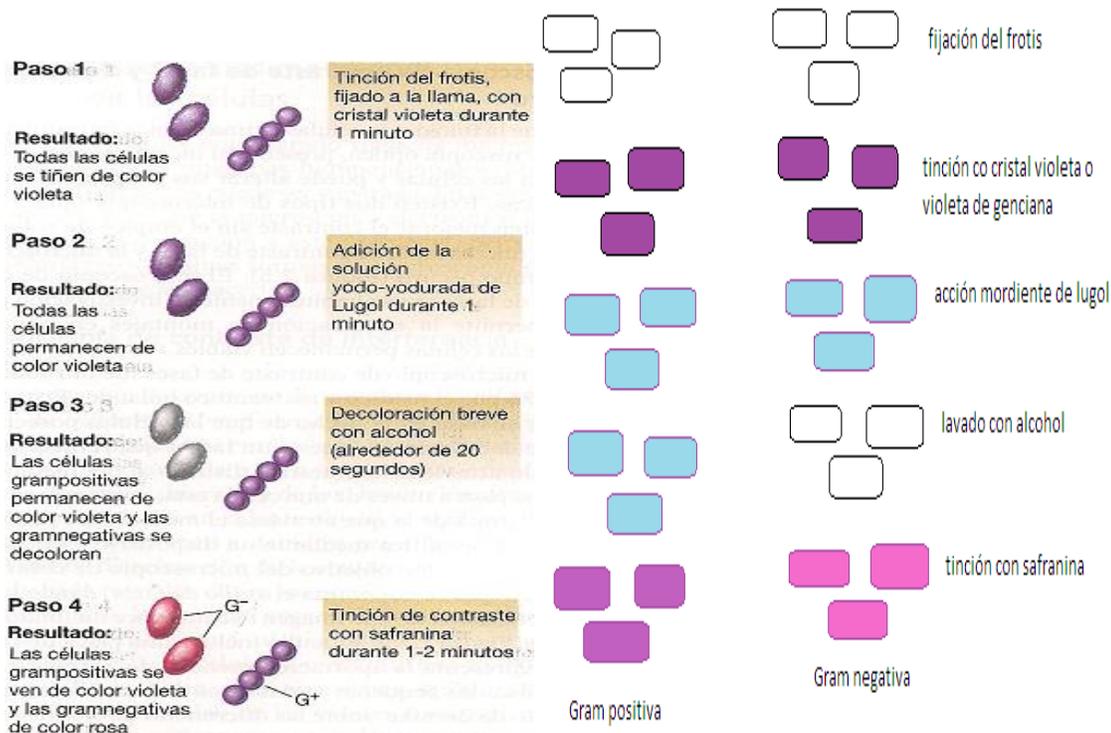


Figura 41. Tinción de Gram en bacterias bacilares.

Tomada de Madigan, *et al.* 2009 y <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/gram-st.jpg> 24 Nov 11



- **Tinción de *Leishmania*:** Es una mezcla de la tinción de Giemsa y de Romanowsky, sirve para visualizar el parásito en una muestra de células macrófagos o dendríticas.

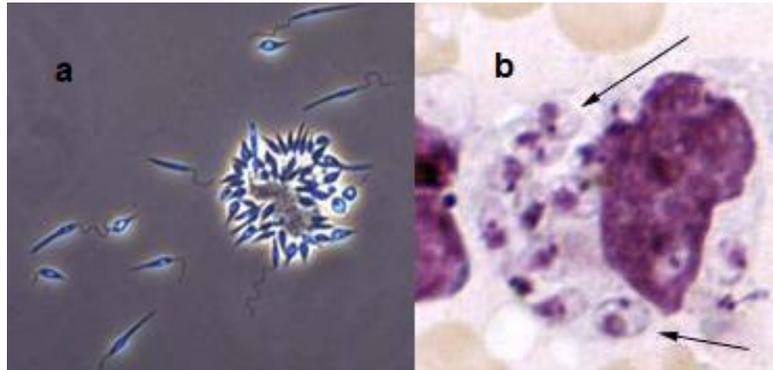


Figura 42. Tinción de Leishmania, el protozoo a) promastigotes en cultivo y b) amastigotes en macrófago.

Tomada de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>

- **Tinción de Ziehl-Neelsen:** Tinción especial para aquellas bacterias ácido-resistentes, como el bacilo que causa la tuberculosis. Resulta difícil teñirlas pero, una vez que el colorante ha penetrado en la bacteria, se conserva después del tratamiento con ácido diluido. La propiedad de resistencia se debe tanto a que en la capa de su membrana celular y dentro de la célula (citósol) poseen lípidos.

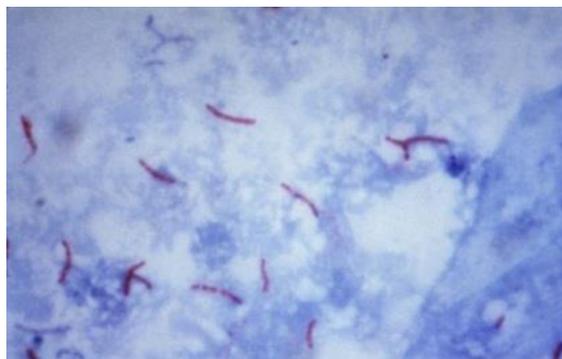


Figura 43. Bacilo causante de la tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis*.

Tomada de <http://www.auxiliaresenfermeria.net/2011/07/la-tincion-para-micobacterias.html>

- **Tinción de azul de metileno:** Para teñir a las bacterias se emplea una mezcla de azul



de metileno, alcohol etílico e hidróxido de potasio (KOH), la cual se vierte sobre la muestra bacteriana y se deja actuar de tres a cinco minutos, se lava posteriormente con agua y se observa al microscopio electrónico.

- **Tinción de cápsulas:** Las cápsulas de las bacterias son frágiles, por lo que no se trabajan con los métodos corrientes, para ellas se utiliza una solución de colorante cristal violeta que se calienta y después se realiza un lavado con sulfato de cobre. La cápsula bacteriana se tiñe de color azul pálido, mientras que la célula y su interior aparecen azul oscuro.
- **Tinción de Esporas:** Algunas especies de bacterias producen intracelularmente estructuras especiales llamadas endosporas, que son células diferenciadas resistentes al calor, agentes químicos y radiación. Funcionan como estructuras de supervivencia para proporcionar al organismo resistencia a condiciones adversas (como temperaturas extremas, desecación, limitación de nutrientes). Los géneros más estudiados con esta técnica son *Bacillus* y *Clostridium*.
- **Método de Schaeffer y Fulton:** Es habitual para teñir esporos, se cubre el frotis con verde malaquita en solución acuosa, dejándolo reposar media hora, después se calienta durante medio minuto hasta observar vapores. El exceso de colorante se elimina con agua y, por último, se aplica safranina. Los esporos retienen el color verde y las partes vegetativas se tiñen de rojo.

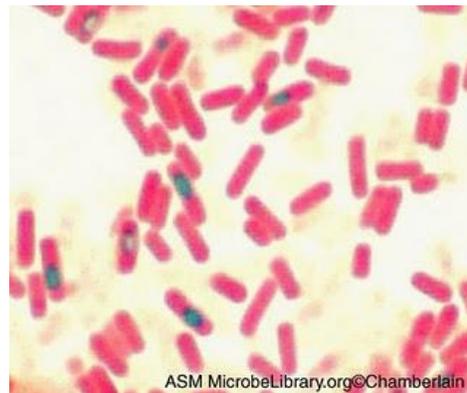


Figura 44. *Bacillus subtilis*, observe los esporos teñidos de verde.
Tomada de <http://bacillus8.blogspot.com/> 25 Nov 11

- **Tinción de flagelos:** Los flagelos de las bacterias son invisibles en las preparaciones corrientes, por lo que solo pueden visualizarse con tinciones especiales. Estos se observan en cultivos bacterianos recientes (12-18 horas), en un tubo con cinco mililitros de caldo nutritivo, se cultiva la muestra procedente de la placa de agar hasta que se observe una ligera turbación, se coloca en la estufa a 37°C durante 1 hr.



Posteriormente se colocan dos o tres gotas de la muestra sin mezclarlas ni extenderlas, se flamean en la parte azul de la llama y se deja secar al aire. Para la tinción se ocupa una mezcla homogénea en agua destilada de fucsina básica, alcohol etílico, ácido tánico y cloruro de sodio. Se coloca el colorante dejándolo actuar de cinco a 15 minutos hasta observar un precipitado y se lava para finalmente observarse al microscopio electrónico. Los flagelos aparecerán de color rosa o rojo y el resto de la célula es de color rosa tenue, o bien sin color.

- **Tinción de Feulgen:** Técnica para teñir nucleótidos, fue descubierta por Robert Feulgen. Se basa en la hidrolización del DNA por medio de una solución diluida de ácido clorhídrico (HCl) donde se van a liberar las bases púricas del ADN.

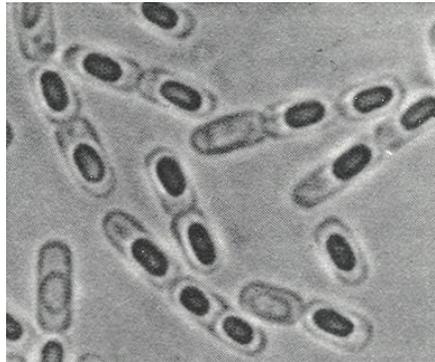


Figura 45. Nucleoides de *Bacillus cereus* teñidas con Feulgen.
Tomada de <http://www.human-healths.com/bacillus-cereus-2/bacillus-cereus.php>

4.3. Obtención de muestras de tejidos vegetales

El reino Plantae contiene cerca de 300 mil especies, tanto acuáticas como terrestres, taxonómicamente están divididas en Algas verdes, Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y Angiospermas. (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al* 2008).

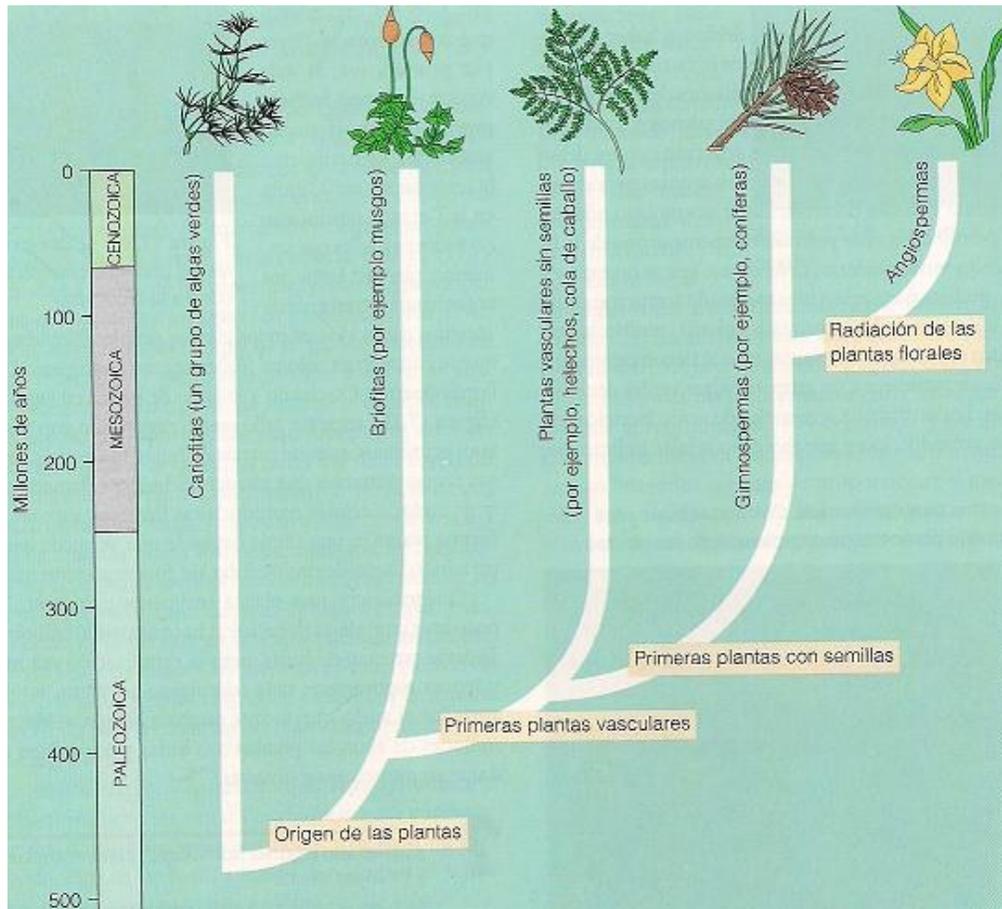


Figura 46. Clasificación de las plantas.
Tomada de Campbell, et al. (2001) pág. 348

Una célula vegetal se diferencia de una animal porque presenta cloroplastos y en la otra no existen; no obstante, hay protozoarios que tienen vacuolas, como la célula vegetal. En las plantas la pared celular es de celulosa, mientras que en los animales es de peptidoglucano; además, la célula vegetal carece de lisosomas y centriolos (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al* 2008).

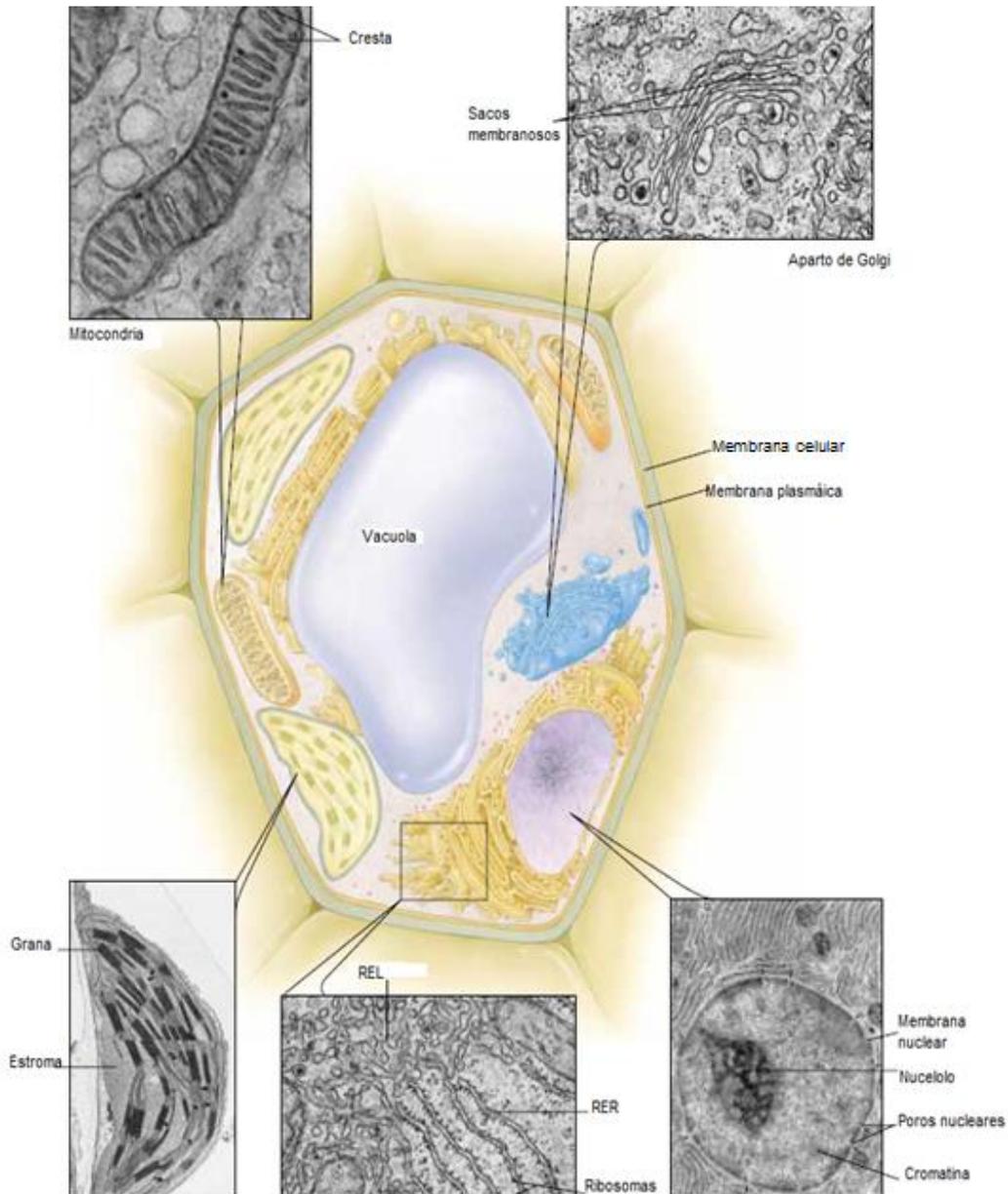


Figura 47. Célula vegetal.
Tomada de Solomon, et al. (2008) pág. 88



Las estructuras atómicas que componen a una planta son: raíz, tallo, hojas, flor y fruto, que contiene a la(s) semilla(s).

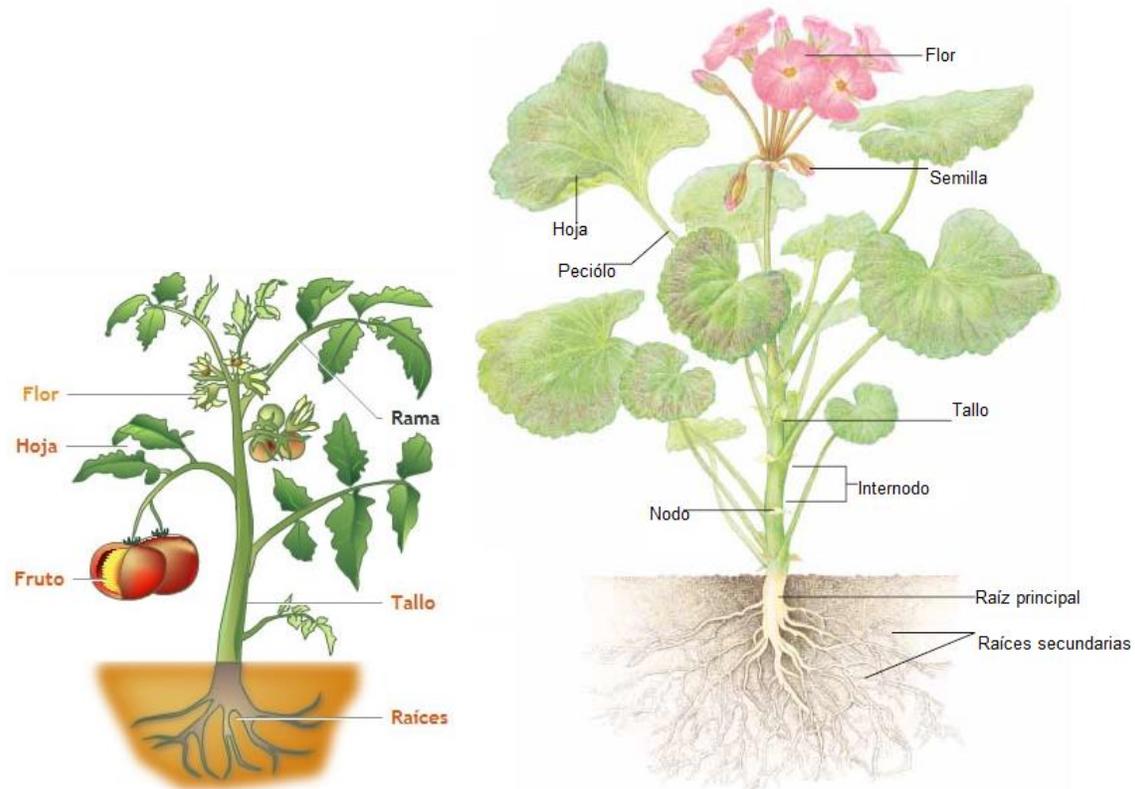


Figura 48. Órganos de una planta.

Tomada de <http://masbotanica.galeon.com/partes-plantas.html> y Solomon, et al. (2008)

A su vez, los órganos contienen a los **tejidos meristemático apical** y **cortical**, así como a los **tejidos adultos diferenciados**, como epidermis, parénquima, colénquima, esclerénquima, floema, xilema, cambium vascular, traqueídas, esclereídas, estomas, tricomas, células corcho, células vasculares (Campbell, et al. 2001 y Solomon, *et al.* 2008).

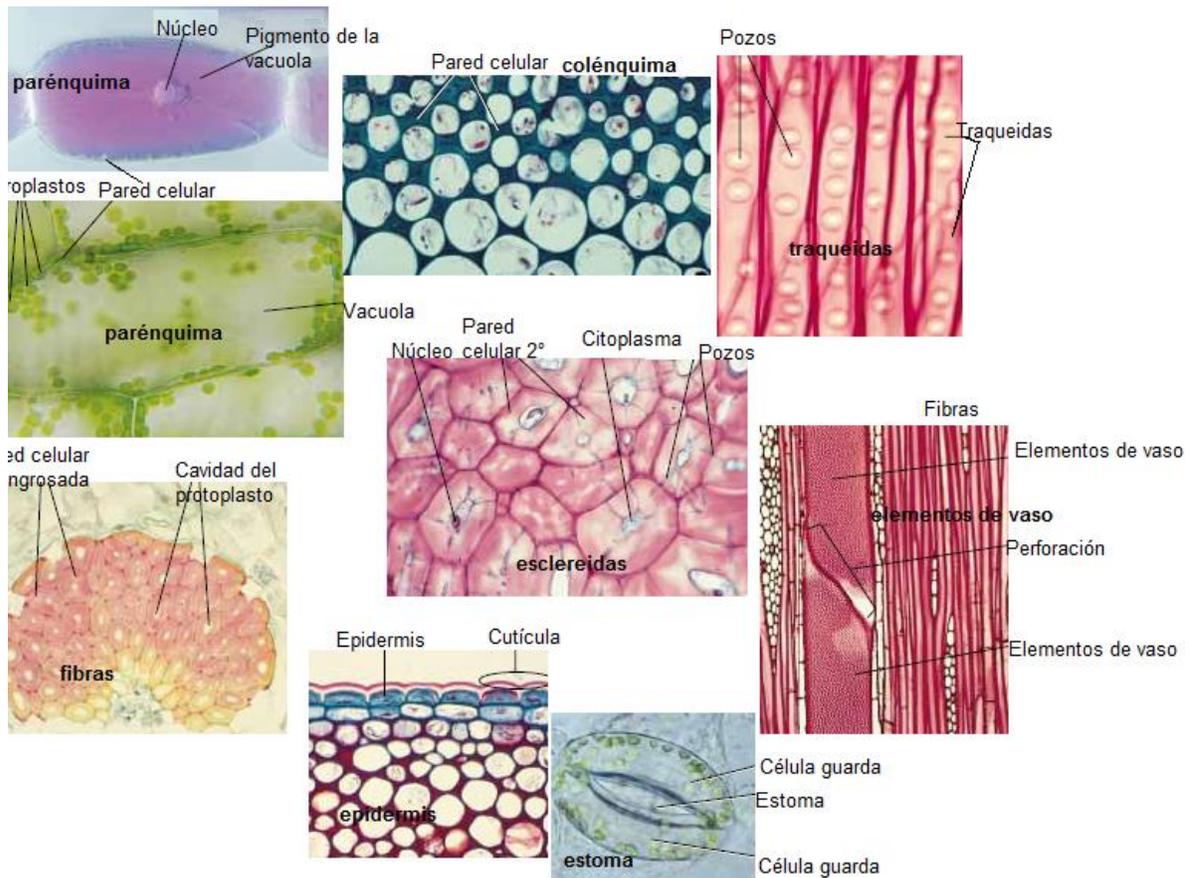


Figura 49. Tejidos de una planta.
Tomado de Solomon, et al. (2008)

Obtener muestras de vegetales es un proceso muy similar al que se detalló para los animales y microorganismos. Hay que tomar en cuenta que forman parte primordial de la vida en la Tierra, ya que son la base de las cadenas tróficas o alimenticias, como productores primarios, y si llegase a pasarles algo, sería de crucial importancia porque de ahí depende el sustento de todos los ecosistemas.

Por ejemplo, hay plagas que afectan a semillas de consumo tanto animal como humano (trigo, maíz, arroz, frijol, café) y si no se hace algo para eliminarlas o disminuirlas, en poco tiempo los cultivos desaparecerán, causando hambrunas y muertes. Por lo tanto, como futuro biotecnólogo, tu deber es investigar a fondo la causa y, mediante una serie de experimentos y ensayos, encontrar una solución eficaz y veraz.

Las plantas no solo son importantes como productores primarios dentro de la cadena trófica, sino que también porque de ellas se extraen componentes medicinales naturales que, gracias a la biotecnología, se fabrican sintéticamente.



Figura 50. Importancia de las plantas ecológicamente.
Tomado de Campbell, et al. (2001) pág. 358

Los vegetales se pueden reproducir de forma **asexual** y **sexual**. La forma asexual es la más rápida para obtener individuos idénticos en corto periodo de tiempo, pero la desventaja es que están a merced de las adversidades. Por ejemplo, si un parásito las ataca, afectará a toda la población y desaparecerán.

Por otro lado, a pesar de que la reproducción sexual se lleva más tiempo, la variabilidad genética incrementa considerablemente y, supóngase el mismo caso de un parásito o una bacteria que ataca cierta población, la respuesta del mejor adaptado va a prevalecer para sobrevivir.

Los grandes fenómenos naturales, como las grandes glaciaciones, terremotos, huracanes, cambio climático (sequías, inundaciones), regulan la cantidad de especies vegetales presentes en la Tierra, aquellas cuya reproducción es asexual han resultado menos agraciadas que las que se reproducen sexualmente.

La vía asexual requiere principalmente de que existan las condiciones adecuadas de nutrientes, suministro de hormonas y agua para que el organismo se desarrolle adecuadamente. Puede ser de dos tipos: **propagación vegetativa natural**, mediante el tallo, raíz, hojas y bulbos se van a formar otros organismos idénticos a la madre; y la **propagación vegetativa artificial**, como el cultivo de tejidos, estacas, injertos y acodos.

En cambio, la fecundidad sexual requiere de la intervención de la parte masculina y femenina de la planta, como el gametofito y el esporofito, los cuales tardan cierto tiempo para llegar a madurar, de ahí la lentitud que se le atribuye. También requiere del auxilio de organismos dispersadores de semillas o polen (polinizadores) o de ciertos medios (como el aire o el agua) para que se pueda llevar a cabo la germinación de las plantas.

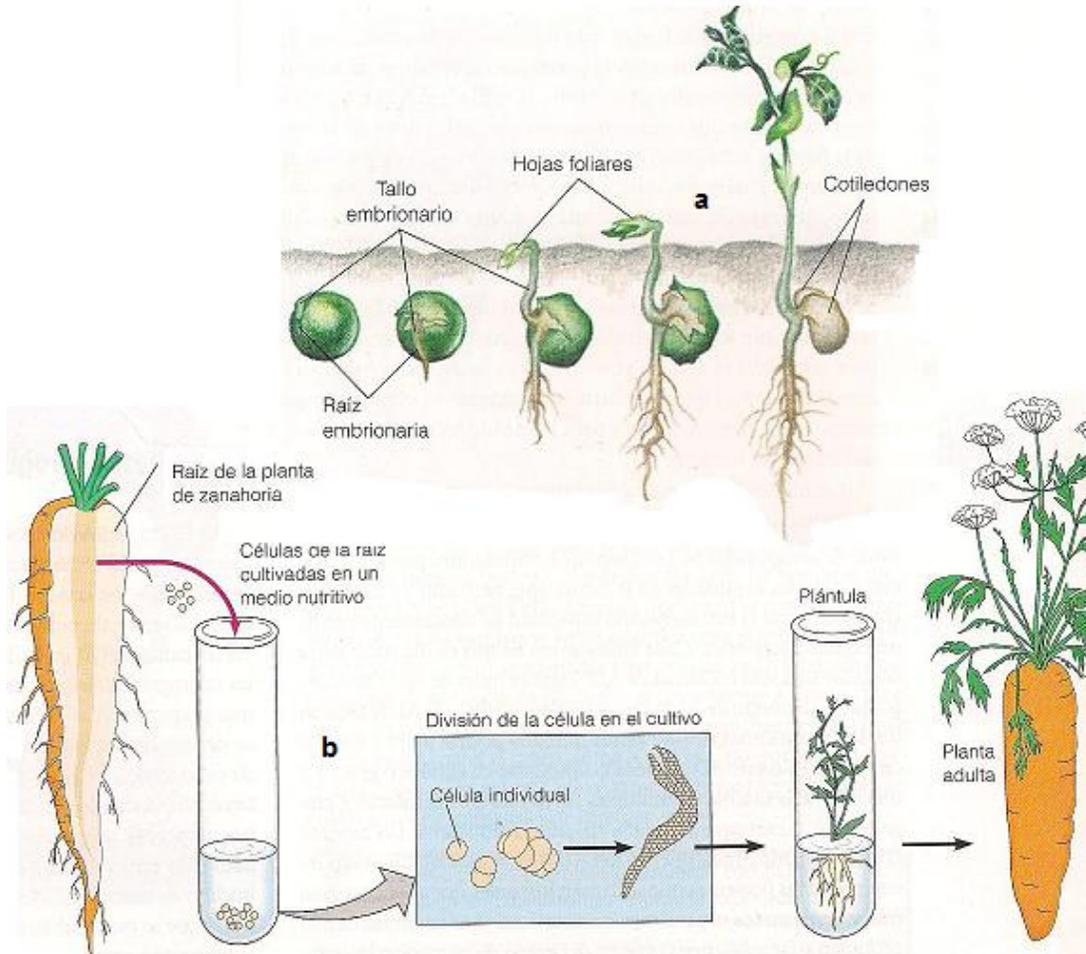


Figura 51. Reproducción en plantas a) sexual y b) asexual
Tomada de Campbell, et al. (2001) pág. 636 y 213

En el laboratorio se simulan las condiciones del hábitat original de la planta, como suelo, temperatura, humedad, altitud. Además se echa mano de macetas, pequeños invernaderos o parcelas de cultivo experimentales, donde se monitorean las variables deseadas para obtener información sobre cierta problemática que se esté analizando.

Suelen colectarse especies de plantas en fresco, completas y enteras, que se colocan en bolsas de plástico y se guardan en una hielera. También pueden colocarse dentro de una prensa o plancha, que contiene periódico para facilitar el secado. Posteriormente se llevan al laboratorio, metiéndolas al refrigerador para evitar que se descompongan o bien se dejan a temperatura ambiente para continuar con el secado.

En el laboratorio se procede a examinarlas con ayuda de un estereomicroscopio, para observar y definir la morfología externa. O bien, mediante una serie de cortes longitudinales o transversales a diferentes órganos (como raíz, tallo, hojas, flor, fruto), para observar sus componentes estructurales internos.



4.3.1. Colorantes para tejidos vegetales

La técnica de coloración para las células y tejidos vegetales es la misma que se utiliza para células animales o microorganismos.

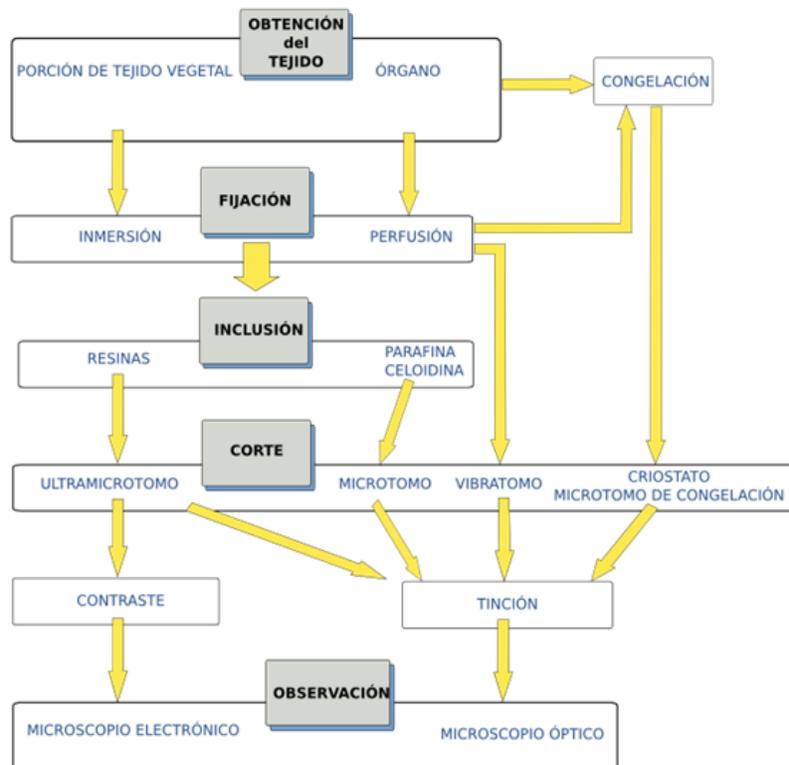


Figura 52. Proceso de tinción.

Tomado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-proceso.php>

El **verde de metilo** es un colorante catiónico (+) que sirve para teñir el núcleo de color verde, se usa en una mezcla con **rojo de pironina**, que tiñe el ARDN contenido dentro del nucléolo. Al observar las muestras en el MET o MEB se puede detectar la cadena de ADN y el ADN ribosomal.

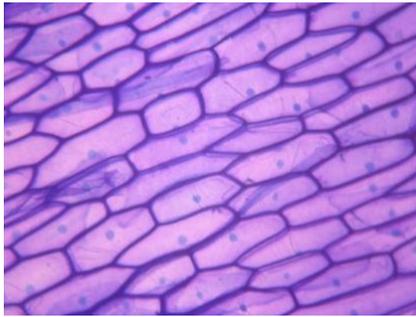


Figura 53. Núcleos teñidos de verde en un corte de epidermis de cebolla.

Tomado de <http://cienciaslacoma.blogspot.mx/2010/12/observacion-de-celulas-vegetales.html>

El **azul de metileno** es un colorante general que, en células eucariotas muertas, tiñe el núcleo y paredes celulares de la mitocondria o de la propia célula. Es un colorante metanocromático que dependiendo del pH puede pintar de color púrpura, y no de azul, a los organelos.

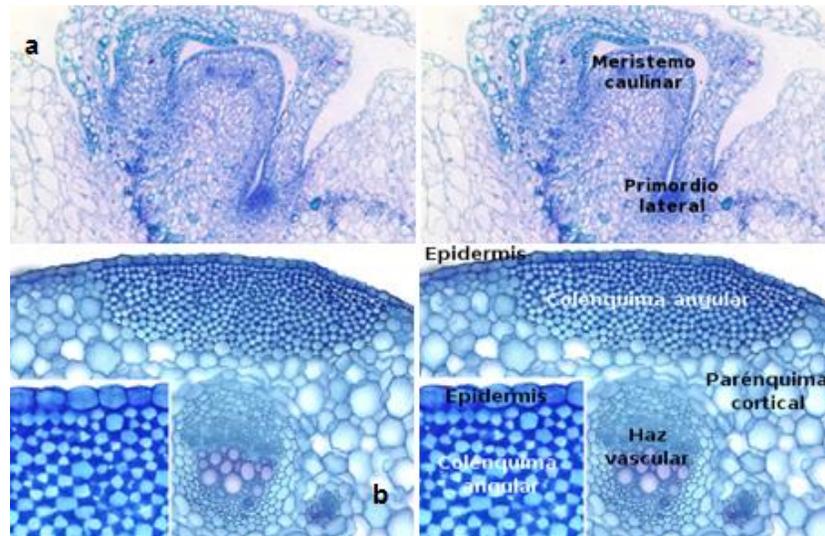


Figura 54. Tinción con azul de metileno a) tejido meristemático de un tallo de uva y b) tejido de sostén de peciolo de hiedra.

Tomado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/1-vegetal/imagenes-todas/imagenes.php>

La **safranina** es una tinción diferencial que tiñe de rojizo oscuro la pared celular y el núcleo de las células, aunque también lo puede hacer de un tono azul fuerte, dependiendo del pH que presenta la muestra.

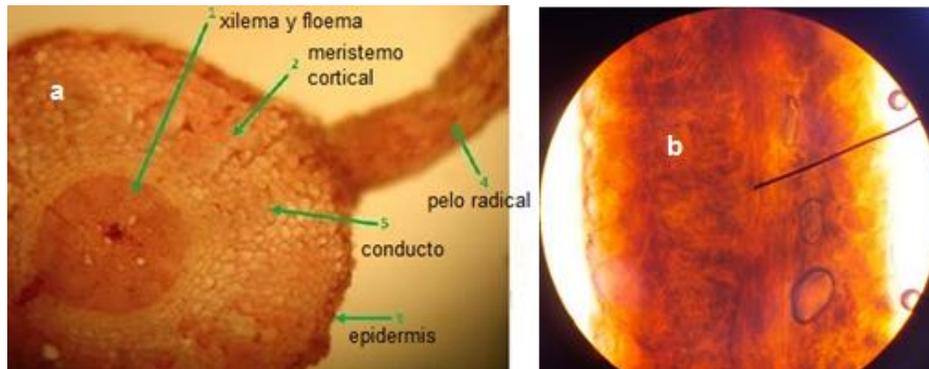


Figura 55. a) Corte transversal de una hoja de hierbabuena teñido con safranina y b) corte transversal de hoja de fresa.

Tomado de <http://monicapolohierbabuena.blogspot.mx/> y <http://histormofovegetal.blogspot.mx/>

La **orceína** es útil para observar el proceso de mitosis en los meristemos de la cebolla, se tiñen los núcleos y las paredes celulares de un tono café-marrón.

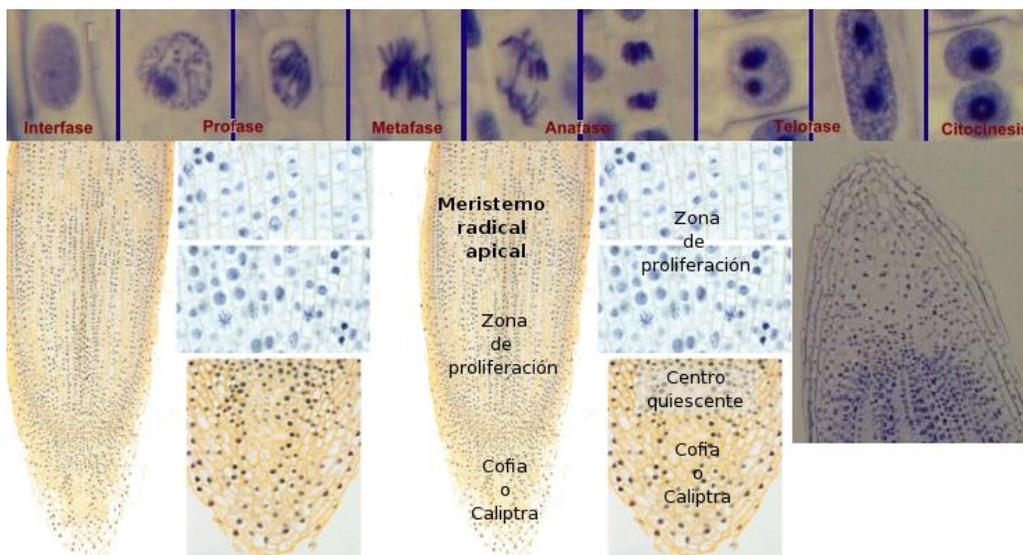


Figura 56. Mitosis en el meristemo de cebolla teñido con orceína.

Tomada de

http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/print.cgi?wid_seccion=19&wid_item=808&wOut=print y <http://webs.uvigo.es/mmegias/1-vegetal/imagenes-todas/imagenes.php>

La tinción de **Lugol** permite diferenciar, con tintes que van de un violáceo oscuro al negro, al tejido de sostén, las células fotosintéticas (cloroplastos), las células de conducción, el núcleo celular, el protoplasma y la pared celular.



La **Tionina** facilita distinguir los tejidos de sostén (colénquima y esclerénquima) y conducción (xilema y floema), de los tejidos protectores y del colénquima. Es un colorante metacromático.

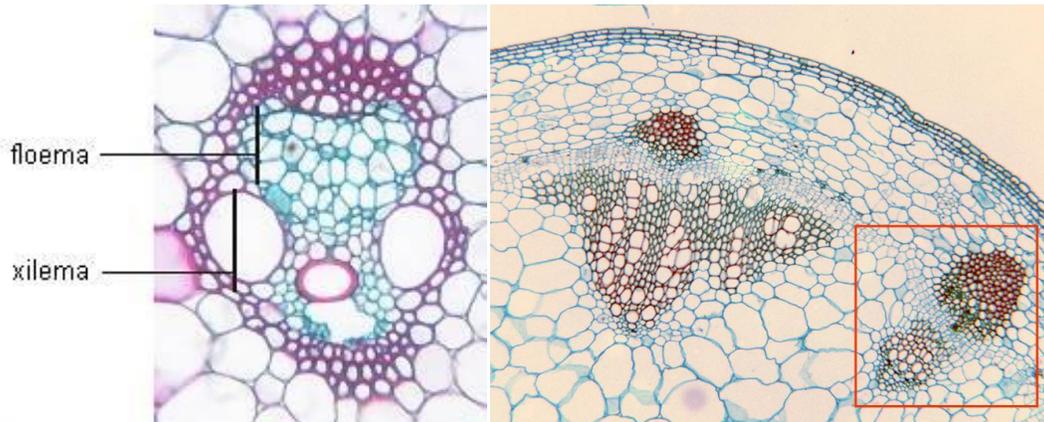


Figura 57. Xilema y floema.

Tomado de <http://profealbarracin.wordpress.com/unidad3/> y <http://virtual.ujaen.es/atlas/tallohelianthus/helianthus10x.htm>

El **Azul alcian** tiñe el parénquima y tejido de sostén, como colénquima.

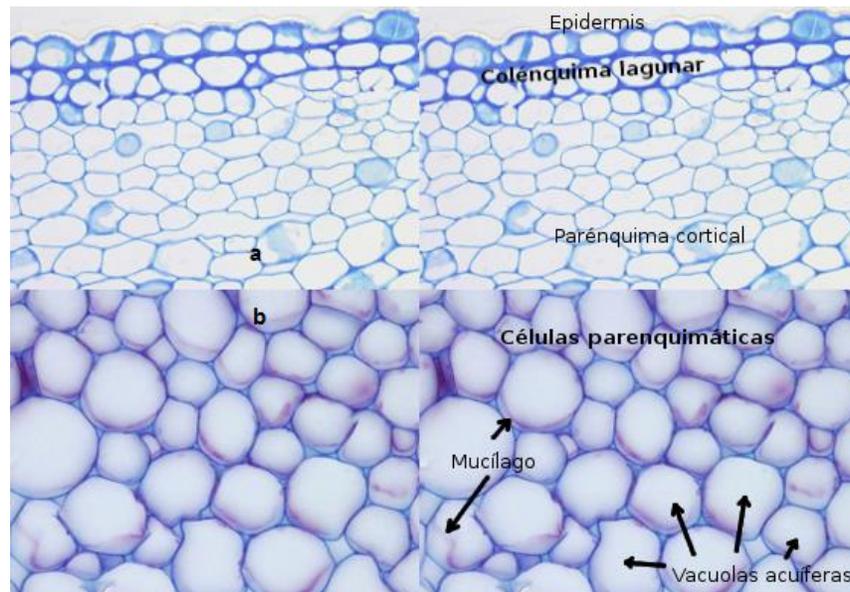


Figura 58. Tinción con azul de alcian a) células de parénquima del tallo de un cactus y b) tejido de sostén (colénquima) del tallo de euforbia.

Tomado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/1-vegetal/imagenes-todas/imagenes.php>



4.4. Obtención de biomoléculas

La vida se compone de **materia**, que es todo lo que ocupa espacio y tiene masa, y está presente en diferentes estados (como una roca, madera, metales, agua, aire). Estos, a su vez, se componen de **elementos químicos**, los cuales están formados por átomos, que son diferentes para cada elemento.

Elementos químicos

Los elementos químicos son sustancias que no pueden dividirse por métodos químicos comunes. Naturalmente existen 92 y otros se han podido obtener solo en el laboratorio, cerca de 25 elementos químicos son esenciales para la vida; C, H, O, N, S y P, se unen entre sí para formar biomoléculas que constituyen el 96% del cuerpo de un ser vivo (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008)

La Tabla 4, basada en Campbell, *et al.* (2001), muestra los 25 elementos necesarios para un ser vivo:

Tabla 4. Elementos que conforman a un ser vivo

Símbolo del elemento químico	Porcentaje en el ser vivo (%)
O	65
C	18.5
H	9.5
N	3.3
Ca	1.5
P	1.0
K	0.4
S	0.3
Na	0.2
Cl	0.2
Mg	0.1
B, Cr, Co, Cu, F, I, Fe, Mn, Mb, Se, Si, Sn, V, y Zn	< 0.01



Toda materia animada está compuesta por elementos químicos, ya que son la base fisiológica para su buen funcionamiento. Por lo tanto, en el corte de un órgano, un tejido o una simple célula, se pueden encontrar una gran cantidad de **biomoléculas**.

4.4.1. Tipos de biomoléculas

Las biomoléculas que se forman con los elementos químicos anteriormente mencionados son: carbohidratos, lípidos o grasas, proteínas y los ácidos nucleicos (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008):

Los **carbohidratos**, hidratos de carbono, azúcares o glúcidos constan de la mezcla de C, H y O. Químicamente su fórmula es $C_n(H_2O)_n$, y pueden ser:

- **Monosacáridos:** Azúcares simples o sencillos, como la glucosa, ribosa, galactosa y fructuosa. La glucosa es la molécula principal utilizada como combustible para el trabajo de las células.
-

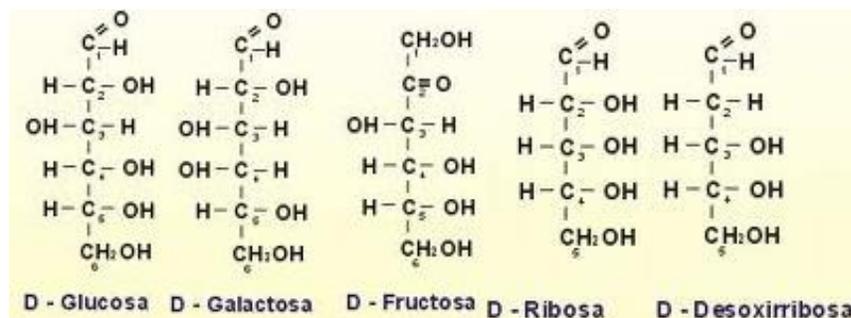


Figura 59. Estructura química de los monosacáridos.
Tomado de <http://biologia.laguia2000.com/bioquimica/monosacridos>

- **Disacáridos:** Azúcares dobles, como la sacarosa (formada por glucosa y fructuosa); lactosa (galactosa y glucosa); maltosa (integrada por dos glucosas). La miel está formada por glucosa y fructuosa; la sacarosa suele obtenerse de los tallos de la caña de azúcar o de las raíces de la remolacha azucarera para hacer azúcar de mesa.

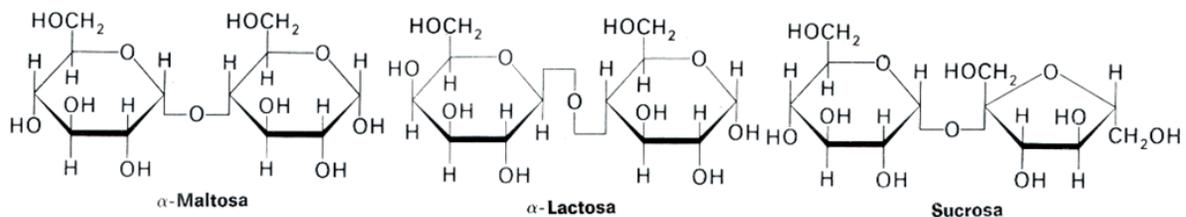


Figura 60. Estructura química de los disacáridos.
Tomado de <http://carbohidratosmoztartencia.wordpress.com/2011/06/26/58/>



- **Polisacáridos:** Son polímeros de cientos o hasta miles de moléculas de monosacáridos unidos (como el almidón, el glucógeno, quitina y la celulosa).

El almidón es un polisacárido de reserva en las raíces de las plantas y otros tejidos vegetales, consta de una mezcla de monómeros de glucosa; el glucógeno es un material de reserva en los animales, se acumula en el hígado y el músculo; la celulosa es un material de estructura, es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra, conforma la pared celular de los vegetales y es un componente principal de la madera. Por último, la quitina forma parte estructural de la pared celular de los hongos y el exoesqueleto de los artrópodos.

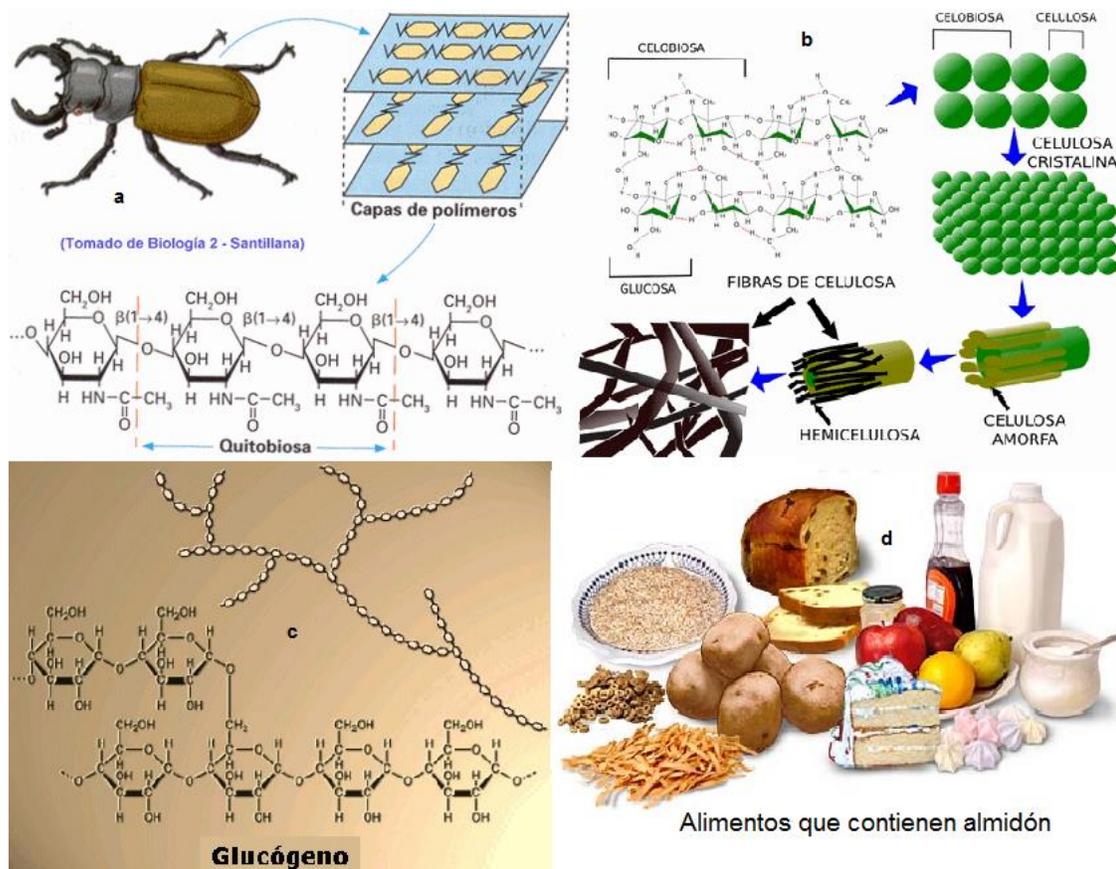


Figura 61. Polisacáridos: a) quitina, b) celulosa, c) glucógeno y d) almidón.

Tomado de <http://biologia.laguia2000.com/bioquimica/polisacridos>,
http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_Farmacia/tema23.htm y
http://www.umm.edu/esp_imagepages/19824.htm

Los **lípidos** son compuestos de átomos de H, C, O, P, S y N. Están representados por las grasas, fosfolípidos, ceras y esteroides.

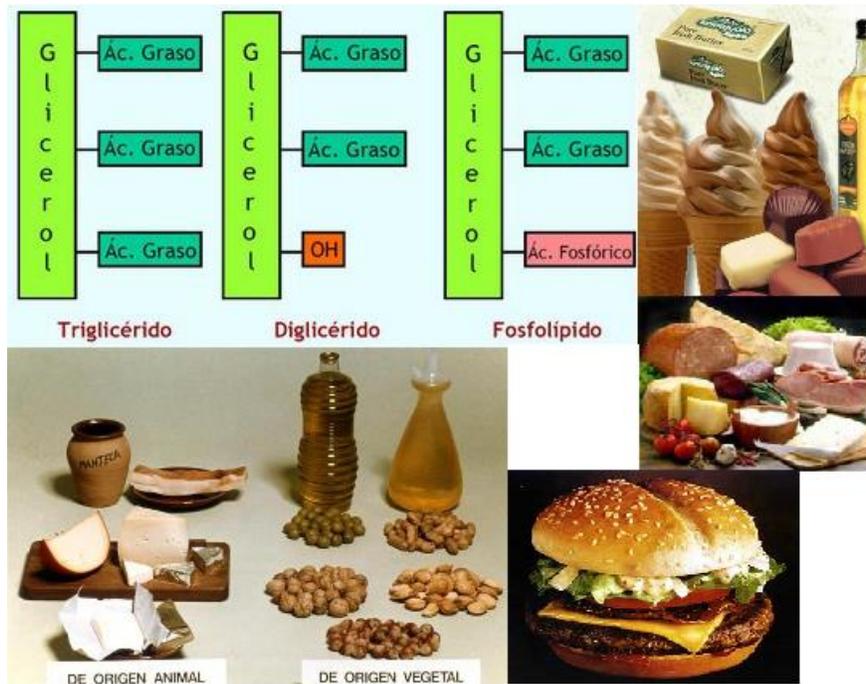


Figura 62. Lípidos.

Tomado de <http://colegiothotalgourmet.blogspot.mx/2009/05/modificaciones-quimicas-en-los-lipidos.html>, <http://www.definicionabc.com/general/lipidos.php>, http://galerias.educ.ar/v/ciencias_naturales/clasificacion_alimentos/lipidos.html

- **Grasas:** Es un tipo de lípidos muy comunes, es la mezcla de un glicerol y un ácido graso. Los aceites son un tipo de grasa que poseen las aves acuáticas en sus plumas y les ayudan a mantenerse a flote en el agua.
- **Fosfolípidos:** Componen las membranas celulares, se parecen a las grasas, solo que contienen P y dos ácidos grasos, en lugar de tres.
- **Ceras:** Constan de un ácido graso unido a un alcohol. Son más hidrofóbicas que las grasas, lo cual hace que la cubierta de las frutas sea muy efectiva, como en manzanas y peras.
- **Esteroides:** Lípidos con un esqueleto de carbono que está doblado y forma cuatro anillos fusionados, tres anillos de seis lados y uno de cinco. Un ejemplo es el colesterol, que es una sustancia muy común en las membranas de la célula animal, precursor en la formación de hormonas sexuales masculinas y femeninas.

Las **proteínas** son un polímero biológico conformado por la unión de aminoácidos. En ellas se diferencian cuatro tipos de estructuras: la **primaria** que es la secuencia específica de aminoácidos; la **secundaria** es la formación en hélice α o lamina β plegada; la



terciaria es la mezcla de diferentes estructuras α y β forma tridimensional del polipéptido; y, finalmente la **cuaternaria** es la unión de las subunidades de polipéptidos (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008):

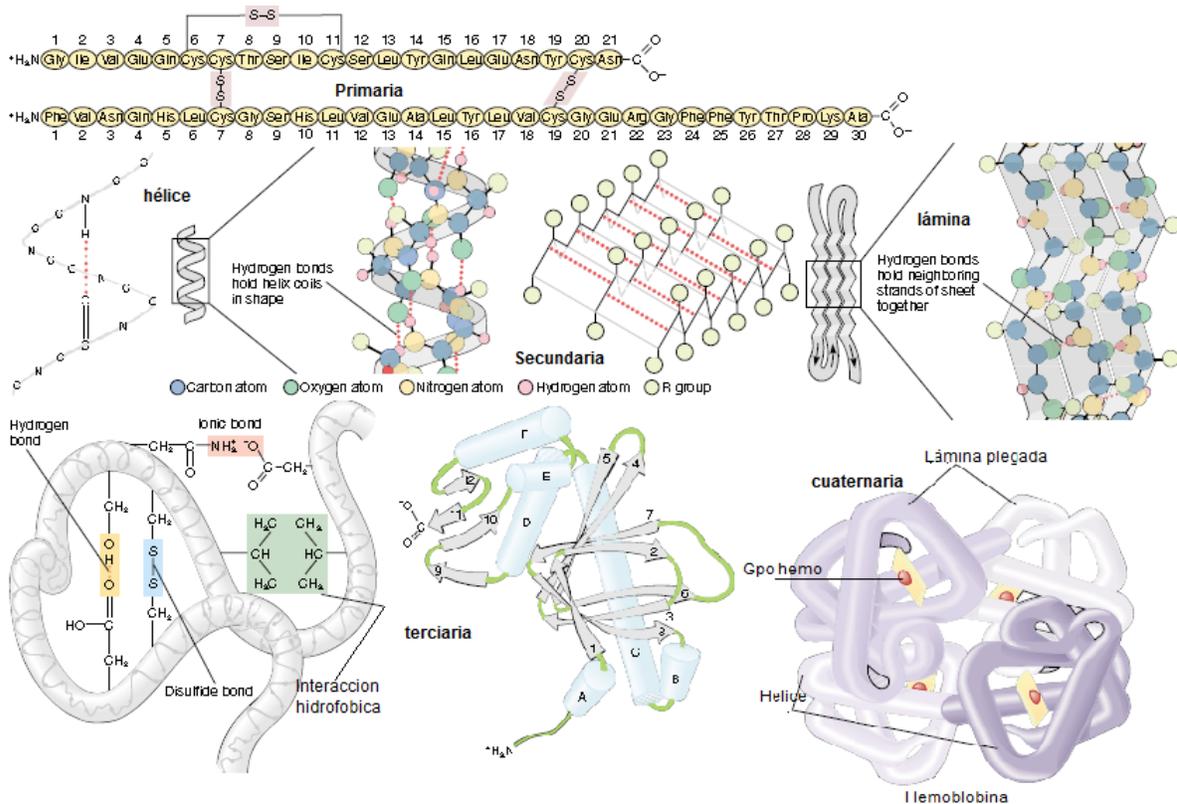


Figura 63. Estructura de las proteínas.
Tomado de Solomon, *et al.* (2008)

Las proteínas son muy diversas en función y estructura, existen siete clases de proteínas (Campbell, *et al.* 2001 y Solomon, *et al.* 2008):

- **Proteínas estructurales:** Forman parte de la seda de las arañas, pelo de mamíferos, fibras que forman tendones y ligamentos.
- **Proteínas contráctiles:** Aquellas que originan el movimiento muscular.
- **Proteínas de reserva:** Como la ovoalbúmina, que está en la clara de huevo que proporciona aminoácidos para los embriones en desarrollo.
- **Proteínas de defensa:** Como los anticuerpos, que luchan contra las infecciones y son transportados por la sangre.



- **Proteínas de transporte:** Incluyen a la hemoglobina, la proteína de la sangre que contiene hierro que lleva oxígeno de nuestros pulmones hasta otras partes del cuerpo.
- **Proteínas notables:** Hormonas que participan en la coordinación de las actividades corporales al actuar como mensajeros de una célula a otra.
- **Proteínas enzimas:** Actúan como catalizadores químicos que modifican la velocidad de reacción, promoviendo y regulando las reacciones químicas en las células.

Los **ácidos nucleicos** son los polímeros que sirven como códigos para las proteínas. Las bacterias y los eucariotas presentan tanto ADN como ARN contenido dentro de su núcleo celular, específicamente en los cromosomas; mientras que en los virus solo está presente un tipo de ADN o ARN y está circundante dentro de su cápsula.

Están formados por un:

Nucleótido: Es un monómero orgánico formado por un azúcar de cinco carbonos unidos en forma covalente a una base nitrogenada y a un grupo fosfato. Los nucleótidos son los elementos de formación de los ácidos nucleicos.

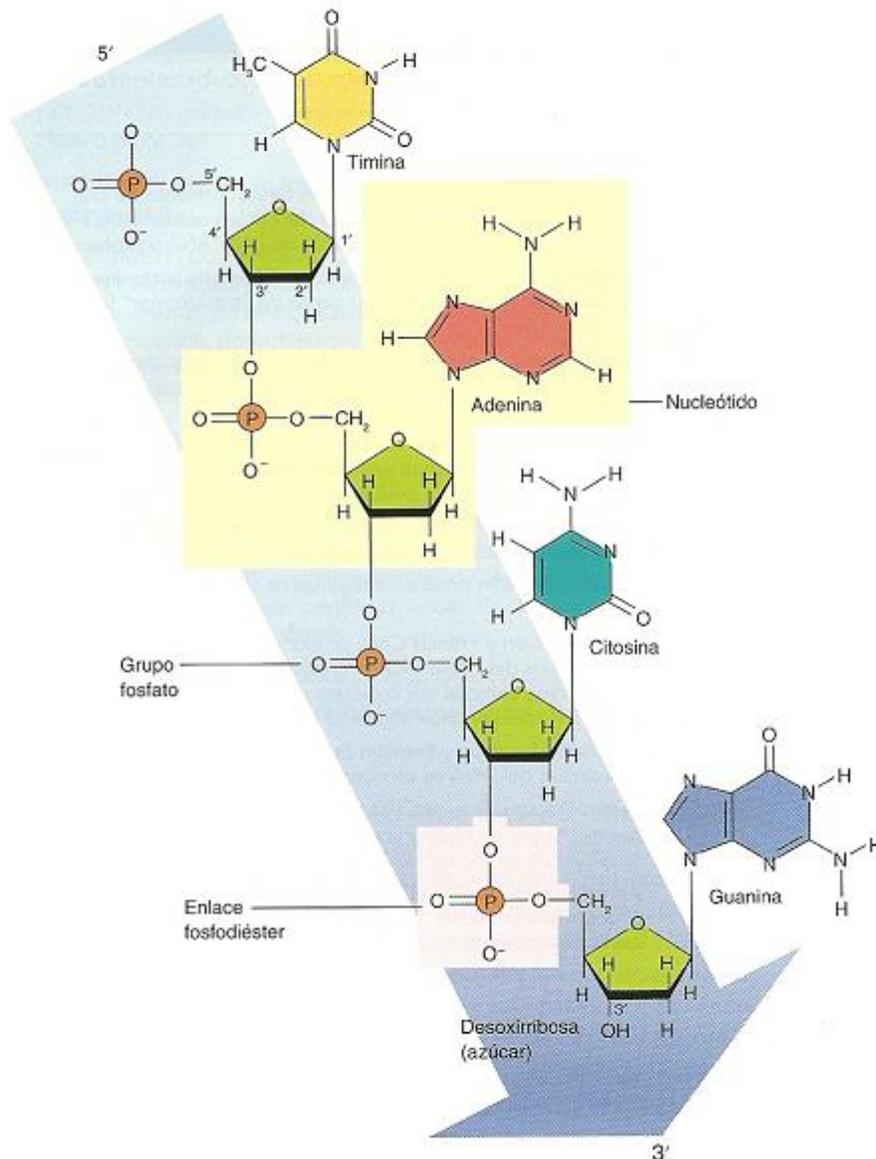


Figura 64. Estructura de un nucleótido que forma parte del DNA.
Tomado de Solomon, et al. (2008)

Ácido nucleico: Polímero que consiste en muchos monómeros de nucleótidos, sirve como una plantilla para sintetizar proteínas, elaborar todas las estructuras y controlar las actividades celulares. Los dos tipos de ácido nucleico son ADN y ARN.

- **ADN o ácido desoxirribonucleico:** Es el material genético que los organismos heredan de sus progenitores; se trata de una macromolécula helicoidal de dos hélices, formada por monómeros de nucleótido con el azúcar desoxirribosa y las



bases nitrogenadas pirimídicas citosina (C) y timina (T), así como las bases nitrogenadas púricas adenina (A) y guanina (G).

- **ARN o ácido ribonucleico:** Es un tipo de ácido que consiste en monómeros de nucleótidos con un azúcar ribosa y las bases nitrogenadas pirimídicas citosina (C) y uracilo (U), y las bases nitrogenadas púricas adenina (A) y guanina (G). Por lo general, formado por una sola hélice; funciona en la síntesis de proteínas y como genoma de algunos virus.

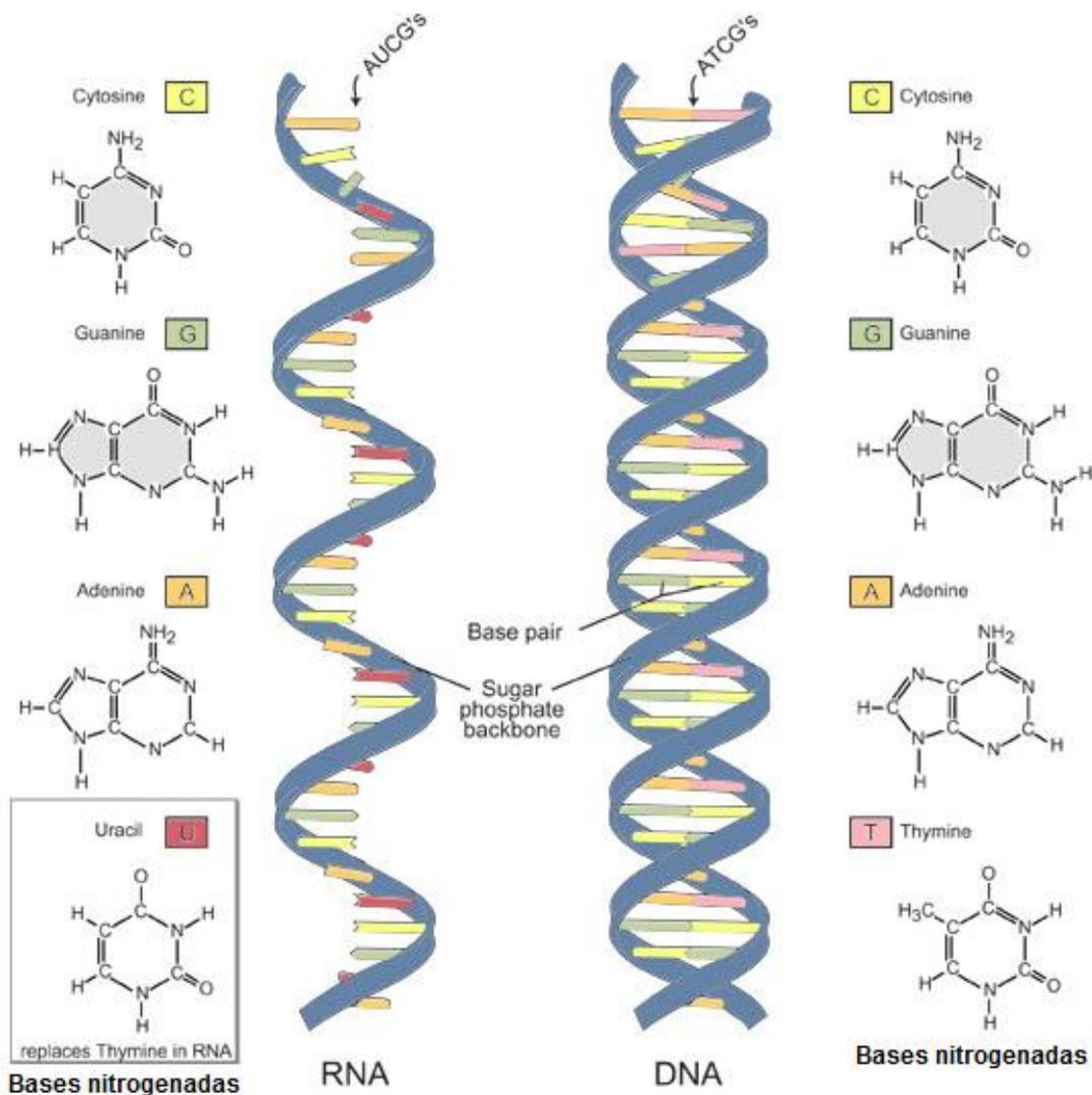


Figura 65. ADN y ARN.

Tomado de <http://paoyflor.blogspot.mx/p/adn-y-arn.html>



4.4.2. Identificación de biomoléculas en el laboratorio

Generalmente las biomoléculas están contenidas dentro de los órganos, tejidos y células de los diferentes organismos y en los alimentos. Para identificar si una muestra contiene biomoléculas, es necesario conocer su origen y, de acuerdo a esto, se podrá obtener información del contenido biomolecular que posee.

Las biomoléculas que se pueden identificar en los experimentos dentro del laboratorio son: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, agua, sales. Se determina el porcentaje presente en los organismos y así se detectan los problemas que presentan y las consecuencias que pueden acarrear.

Si se desea conocer el valor alimenticio en carbohidratos, lípidos y grasas de un alimento que se está produciendo por primera vez en la industria, hay que realizarle una serie de pruebas de calidad que permitan conocer la concentración porcentual, en gramos o miligramos, que van a estar disponibles para el consumidor.

4.4.3. Uso de reactivos y colorantes en la obtención de biomoléculas

En los órganos, tejidos y células se pueden utilizar reactivos y colorantes para teñir ciertas biomoléculas, también pueden estar presentes en las muestras a analizar, como bebidas, alimentos, exudados de mucosas, secreciones del cuerpo, líquidos que emanen del organismo, entre otros.

- **Tinción con eosina:** Tiñe **proteínas** en tonos rojos en una muestra.
- **Azul brillante de Coomassie:** Es un colorante de tipo marcador que tiñe de azul brillante las **proteínas** en la electroforesis en gel.



Figura 66. Tinción de proteínas.
Tomado de <http://www.datuopinion.com/azul-de-coomassie>

- **Sudán:** Colorante que sirve para pintar moléculas bioquímicas como **lípidos y triglicéridos**. Se necesita una muestra de tejido adiposo o de soluciones que contengan mezcla de grasas o aceites; dichas moléculas se van a mostrar al microscopio teñidas de un color marrón a rojo oscuro.



- **Sudan III:** Pinta los **lípidos** de color rojo.
- **Sudan IV:** Colorea los **lípidos** de color negro.

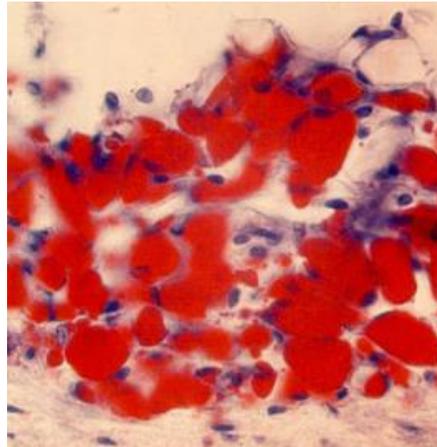


Figura 67. Tejido adiposo donde se observan los lípidos teñidos con Sudán.
Tomado de <http://ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/Unidad1A/deteli.htm>

- **Lugol:** Tiñe carbohidratos, principalmente gránulos de **almidón o amiloplastos** presentes en los tejidos de las plantas y que son su reservorio. Por ejemplo, al agregar lugol a una muestra de papa rayada y harina, se teñirá de color morado, evidenciando la presencia de almidón un polisacárido.

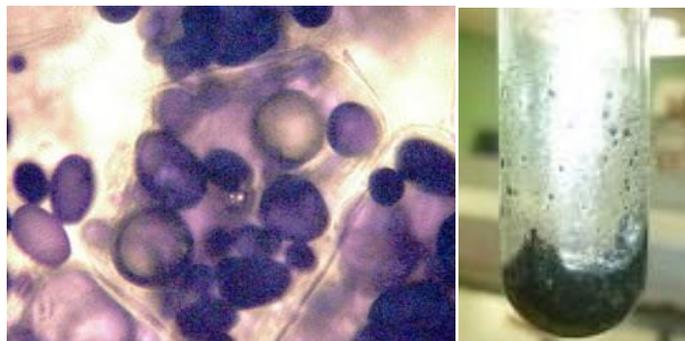


Figura 68. Gránulos de almidón.
Tomado de <http://elprofedebiolo.blogspot.mx/2010/01/tecnicas-de-tincion.html> y <http://farmaciaulat.blogspot.mx/p/i/identificacion-de-biomoleculas.html>

- **Reactivo Benedict:** Sirve para determinar la presencia de **azúcares** en una muestra.

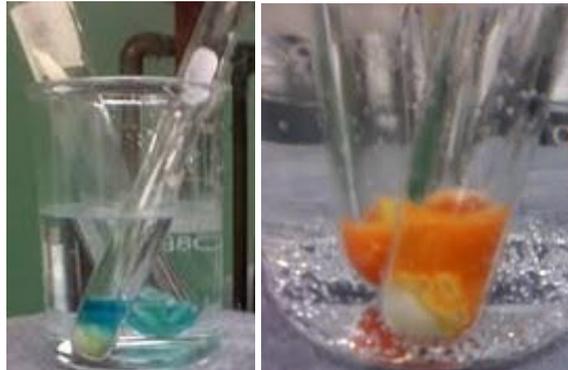


Figura 69. Azúcares.

Tomado de <http://farmaciaulat.blogspot.mx/p/identificacion-de-biomoleculas.html>

- **Biuret:** Reactivo usado comúnmente para detectar proteínas, en este caso la ovoalbúmina presente en el huevo.



Figura 70. Azúcares.

Tomado de
<http://farmaciaulat.blogspot.mx/p/identificacion-de-biomoleculas.html>

- **Tetraóxido de osmio:** Sirve para detectar la presencia de **lípidos**, que se tiñen en color negro.

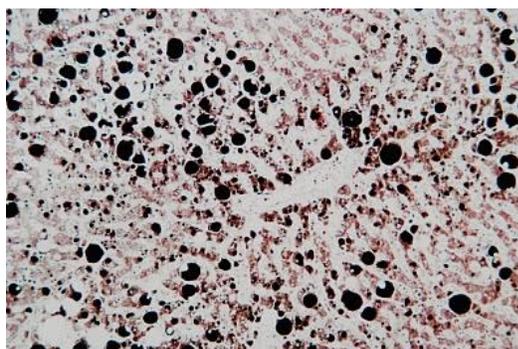


Figura 71. Presencia de lípidos en un corte de hígado.

Tomado de <http://forensic-histopathology-garfiaa.blogspot.mx/2010/06/72-iv-sudden-unexpected-death-related.html>



- **Hematoxilina:** Tiñe de color violeta los **ácidos nucleicos** dentro del núcleo.

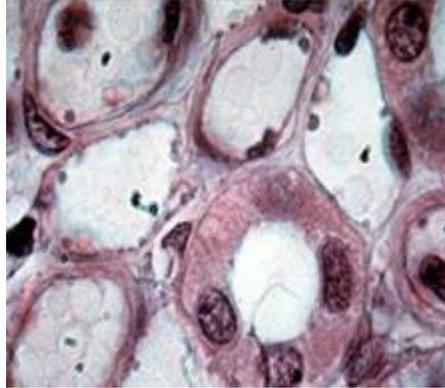


Figura 73. Tinción de ADN con hematoxilina.

Tomado de <http://es.scribd.com/doc/29873050/2752-Tecnicas-de-Colecta-y-Tincion-de-Parsitos>

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu figura académica, mismo que te indicará, a través de la *Planificación de actividades*, la dinámica que tú y tus compañeros (as) llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Para el envío de tus trabajos usarás la siguiente nomenclatura: BTLB_U4_A1_XXYZ, donde BTLB corresponde a las siglas de la asignatura, U4 es la etapa de conocimiento, A1 es el número de actividad, el cual debes sustituir considerando la actividad que se realices, XX son las primeras letras de tu nombre, Y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.

Autorreflexiones

Para la parte de autorreflexiones debes responder las *Preguntas de Autorreflexión* indicadas por tu figura académica y enviar tu archivo. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación.

Para el envío de tu autorreflexión utiliza la siguiente nomenclatura:



BTLB_U4_ATR_XXYZ, donde BTLB corresponde a las siglas de la asignatura, U4 es la unidad de conocimiento, XX son las primeras letras de tu nombre, y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.

Cierre de la unidad

En esta unidad te pudiste dar cuenta de qué tipo son las muestras que se pueden trabajar dentro del laboratorio, pudiendo ser estas desde virus, procariotas como arqueas, bacterias, eucariotas como protistas, hongos, plantas y animales, con su gran variedad que existen.

La forma de obtener la muestra, sea viva o muerta, es muy importante, ya que hay que tomar en cuenta el hábitat del organismo, su ciclo de vida para tener conocimiento en qué tiempo hay que tomar la muestra, dependiendo de la investigación que se esté realizando.

Después de localizar la muestra hay que procesarla para observar los cortes o frotis preparados mediante una serie de técnicas de tinción, utilizando sustancias como colorantes o reactivos que van a hacer más visibles las características estructurales de los tejidos, células o biomoléculas que sean de interés al trabajarlas en el microscopio.

Las muestras se pueden procesar mediante una gran variedad de técnicas, dependiendo del enfoque de la investigación. Es muy importante que la metodología sea la adecuada, puesto que en la mayoría de los casos se trabaja con reactivos y esto es muy peligroso; además de que algunos son muy costosos y no sería correcto desperdiciarlo. Se recomienda trabajar siempre bajo la supervisión de un experto, para que en caso de algún percance él te auxilie.

Con esto estamos dando por culminado tu curso de la asignatura de Técnicas de laboratorio en biología, por lo que ya te has dado cuenta que los instrumentos y aparatos que hay dentro son importantes. Conoces también la manipulación de sustancias y reactivos en las actividades que se llevan a cabo en procesos con aplicaciones biotecnológicas.

Además, aprendiste el uso de los diferentes tipos de microscopios, dependiendo las observaciones que se necesiten realizar, desde las más sencillas en el microscopio óptico hasta las más complejas en un microscopio electrónico de barrido o de transmisión, así como el uso de colorantes y reactivos en técnicas para analizar las muestras de cortes de tejidos, células o identificación de biomoléculas.



Para saber más



- Se te recomienda leer el artículo sobre la enfermedad de Chagas que encontrarás en la liga http://www.paho.org/spanish/dd/ais/BE_v3n3.pdf, te ayudará a reforzar los conocimientos de los protozoarios.
- Se te recomienda leer el artículo sobre la malaria que encontrarás en la liga <http://viajarsano.com/pdf/paludismo.pdf>, te ayudará a reforzar los conocimientos de los protozoarios.
- Se te recomienda leer el artículo sobre la amebiasis intestinal que encontrarás en la liga <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/v33n2a6.pdf>, te ayudará a reforzar los conocimientos de los protozoarios.
- Se te recomienda leer el artículo sobre la leishmaniasis que encontrarás en la liga <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>, te ayudará a reforzar los conocimientos de los protozoarios.
- Se te recomienda ver el siguiente video <http://www.youtube.com/watch?v=ucgf-FCg39g&feature=related>, te ayudará a reforzar los conocimientos sobre microorganismos.
- En este video podrás constatar cómo es que se llevan a cabo las técnicas de tinción para microorganismos <http://www.youtube.com/watch?v=1Zu6HHcEXSA>



Fuentes de consulta



Bibliografía básica

- Gaviño de la T. G., Juárez, L. C. y Figueroa, T. H. H. (1999). *Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo*. México, DF: Limusa.
- Todd, Sanford. (2007). *Laboratorio*. Madrid: Marbán.
- García, José Santos. (2009). *Fisiología de microorganismos. Manual de laboratorio*. México, DF: Trillas.

Bibliografía complementaria

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Biología Molecular de la Célula*, 4a ed. New York: Garland Science.
- Barthelemy, E. R., Dawson, R. J. y Lee, A. E. (1976). *Técnicas de laboratorio de biología*. México: CECSA.
- Brooks, G. F., Carroll, C. K., Mietzner, a. T., Butel, J. S. y Morse, S. A. (2011). Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología Médica*, 25a ed. México, DF: Mc Graw Hill.
- Campbell, A. N., Mitchell, G. L. y Reece, B. J. (2001). *Biología, conceptos y relaciones*, 3a ed. Edo de México, Naucalpan: Pearson. Addison-Wesley.
- Chang, R. y College, W. (2002). *Química*, 7a. ed. México, DF: Mc Graw-Hill.
- García del V, A. y Zamudio, D. C. M. M. (1998). *Manual de Microbiología Médica*. FES-Zaragoza de la Carrera QFB, 9° semestre. México, DF: UNAM.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*, 12a. ed. España, Madrid: Pearson Adison-Wesley.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (2000). *Microbiología*, 4a. ed. España, Madrid: McGraw-Hill Interamericana.



- Ramos, L. A., Ramírez, S. M. E., González, H. J. C., Rosales, E, J. L. y López, M. A. (2006). Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. *Salud Pública de México*. (48):1: 13-21. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000100004
- Rodríguez, V. R. I. y Cob, G. L. A. (2005). *Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria*, 2a. ed. México, Veracruz: Ediciones de la Universidad Autónoma de Veracruz.
- Solomon, P. E., Berg, R. L. y Martin, W. D. (2008). *Biología*, 8a. ed.). México. Mc Graw Hill.
- Zarco, R. E. (1998). *Seguridad en Laboratorios*, 2a. ed). México, DF: Trillas.