

Sigla: B-0330

Nombre del curso: Microtécnicas

Créditos: 3

Horas lectivas: 2 hr. teoría, 4 hrs. laboratorio

Requisitos: B-0239 Botánica II

Ciclo lectivo: II/14

Profesor: Master Jesús A. Rodríguez Arrieta

Colaboradora: M.Sc. Ethel Sánchez Chacón

Descripción:

Este curso permite el aprendizaje teórico-práctico de las técnicas básicas empleadas en la disección, montaje, preservación y visualización de muestras biológicas con el fin de ser analizadas bajo diferentes tipos de microscopio, principalmente de luz. Las técnicas para el manejo de muestras en este curso tienen una alta relevancia en la investigación actual y abarcan temas teóricos de botánica, zoología, ficología, microbiología, patología, genética y estudios ambientales en general.

El estudiante adquiere los conocimientos básicos de montaje de muestras biológicas en diferentes medios resinosos, sus ventajas y desventajas, cuidados en el uso de portaobjetos y cubreobjetos. El curso abarca técnicas de montaje y preservación de muestras histológicas y celulares. Asimismo, adquiere conocimientos sobre el procesamiento básico de muestras en microscopía de fluorescencia.

Objetivos específicos:

1. Conocer las técnicas básicas de fijación, montaje y preservación de preparaciones fijas y temporales de tejidos biológicos.
2. Aprender las técnicas y protocolos para la visualización de muestras biológicas en microscopios de luz y de fluorescencia.
3. Realizar preparaciones de reactivos siguiendo protocolos establecidos para la visualización de material biológico bajo el microscopio de luz.
4. Adquirir las destrezas necesarias para realizar prácticas de laboratorio efectivas a nivel de investigación científica.

Contenidos y cronograma

El curso se sustenta en 16 semanas lectivas en total, una gira de una mañana, siendo la última semana de evaluación de los resultados obtenidos a lo largo del curso. En cada semana se dará una introducción teórica breve (1 hora cada clase) donde se expondrán los conocimientos básicos (columna denominada contenido) para realizar posteriormente el trabajo de laboratorio de 4 horas en esa misma semana (columna denominada actividades). En el siguiente cuadro se muestra el resumen de las actividades con el cronograma semanal de los contenidos del curso.

Semana	Contenido	Actividades
1	El trabajo en el laboratorio, cuidados, organización y buenas prácticas de laboratorio (BPL)	Demostración del uso de equipo básico de laboratorio. Cuidados y seguridad en el laboratorio
2	Preparación de las disoluciones	Clase: Matemáticas en el laboratorio
3	Los estudios postmortem y la fijación de las muestras	Teoría y práctica de los diferentes fijadores en muestras biológicas, especial énfasis a los fijadores que se utilizarán durante el curso. Quiz 1.
4	Procesamiento de tejidos (deshidratación)	Práctica sobre deshidratación de muestras histológicas.
5	Procesamiento de tejidos (infiltración)	Práctica sobre infiltración de muestras histológicas.
6	Inclusión y microtomía	Continuación práctica semana 5.
7	La tinción de los tejidos	Práctica de tinción de tejidos. Quiz 2.
8	El montaje sobre las láminas	Práctica con medios de montaje, clarificación y medios de montaje permanente
9	Histotecnología animal	Práctica básica (incluye técnicas de fijación, deshidratación, inclusión y montaje) de tinción de tejido animal.
10	Histotecnología animal	Práctica básica (incluye técnicas de fijación, deshidratación, inclusión y montaje) de tinción de tejido animal. Quiz 3.
11	Histotecnología vegetal	Práctica básica (incluye técnicas de fijación, deshidratación, inclusión y montaje) de tinción de estructuras vegetales.
12	Histoquímica vegetal	Práctica básica (incluye técnicas de fijación, deshidratación, inclusión y montaje) de tinción de estructuras vegetales. Quiz 4.

13	Visita a Centro de Investigación en Patología (durante la mañana)	Demostración del manejo automatizado de muestras a nivel patológico.
14	Inmunohistoquímica de tejidos animales	Teoría y práctica básica de tinción de tejido animal con agentes de inmuno-marcaje. Quiz 5.
15	Inmunohistoquímica de tejidos animales	Continuación semana 14
16	Obtención y discusión de resultados del proyecto semestral	Entrega del trabajo del laboratorio

Metodología y actividades para cumplir con los objetivos

El curso incluye la visita a un centro de investigación, donde actualmente se llevan a cabo proyectos de investigación empleando conocimientos de la microscopía y técnicas de montaje y fijación de muestras biológicas en cada caso. Además, con el fin de introducir los usos y metodologías prácticas en el campo de la investigación se dan ejemplos aplicados en cada una de las prácticas.

En el Laboratorio 270 se tendrá acceso al uso de micrótomos, esto permitirá que los estudiantes puedan familiarizarse con las diferentes metodologías que pueden emplear para la preparación de material biológico. Antes de aprender a utilizarlos, tienen que someter diferentes tejidos animales y vegetales (según el acceso a las muestras) a un proceso de fijación química o física, un proceso de deshidratación y posteriormente un proceso de embebido en parafina o en resina. Una vez solidificado este medio, se realizan cortes de grosores a nivel micrométrico. Estos cortes serán vistos bajo el lente de un microscopio, señalando y describiendo estructuras y procesos biológicos detenidos durante la fijación inicial.

El estudiante aprenderá a usar diferentes medios para montar especímenes: se le suministrará resinas que se encuentran en el mercado y medios de montaje (como Hoyer que se preparan en el laboratorio y es de mucha utilidad en el trabajo de campo y en el montaje de especímenes para evaluar su taxonomía. También se tendrá acceso a medios como glicergel para el montaje de estructuras histológicas de animales y montaje de tejidos

celulares delicados). Esta etapa es importante porque desarrolla destrezas del uso de portaobjetos, cubreobjetos, especímenes biológicos, resinas y obtención de las primeras preparaciones permanentes en un proyecto de investigación.

Como parte de las prácticas de laboratorio, los estudiantes prepararán cortes para teñirlos con diferentes agentes colorantes y de acuerdo a las características que se desea resaltar: células, tejidos, núcleos, características de la pared celular, inclusiones, o bien el marcaje de un proceso celular específico empleando técnicas de inmunomarcaje en una preparación *in vivo* o previamente fijada, según sea el objetivo del proyecto que se lleve a cabo en el curso.

Evaluación

A continuación se detalla la evaluación comprendida para el curso de Microtécnicas.

Actividad	Porcentaje con respecto a la nota final
Quices de los temas repasados en clase (8% C/U)	40
Prácticas de laboratorio realizadas*	30
Presentación final del trabajo	30
Nota final	100

*Incluye: la presentación de las preguntas de cada práctica (10%) y la libreta de laboratorio completa (20%) con el trabajo realizado por el estudiante en cada una de las prácticas. La asistencia a las actividades de laboratorio es obligatoria, el estudiante pierde el curso al acumular tres ausencias injustificadas.

Al finalizar el curso se evalúa un trabajo final escrito (30%) (a modo de artículo o informe científico), este trabajo se formulará desde el inicio del curso. Iniciará con la propuesta escrita por parte de los estudiantes, seguido del procesamiento de material o muestras y la descripción de resultados. Finalizará con la elaboración de un manuscrito describiendo las estructuras observadas al concluir el procesamiento de la muestra.

Como parte de los objetivos de este proyecto, el estudiante debe de caracterizar y/o describir estructuras y procesos biológicos, para ello es muy importante la revisión de literatura. La metodología empleada debe de comprender, en alguna medida, el uso de la microscopía convencional de luz. Los resultados y el análisis de estos deben de ser de autoría propia, basándose de ser necesario en conocimientos previos publicados en revistas científicas del tema, las referencias y citación son de uso obligatorio. Todo esto será considerado en la evaluación final.

Bibliografía

*Chiarini-Garcia, H. y R. Melo (eds). 2010. Light Microscopy: Methods and Protocols. Human Press Inc. New Jersey, USA.

Clark, G. (ed) 1981. Staining Procedures. Publicado por Biological Stain Commission de Williams y Wilkins, Baltimore, London.

Echlin, P. 2009. Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Cambridge Analytical Microscopy, UK. Springer Press.

Gray, P. 1964. Handbook of Basic Microtechnique. Mcgraw-Hill Book Co.

Grimstone, A. V. y R. J. Skaer. 1972. A Guidebook to Microscopical Methods Cambridge at University Press.

Kearns, C. A. y D. W. Inouye. 1993. Techniques for Pollination Biologists University Press of Colorado.

Kuo, J. 2007. Electron Microscopy: Methods and Protocols. Human Press Inc. New Jersey, USA.

Lewis, P.R. y D.P. Knight. 1992. Cytochemical Staining Methods for Electron Microscopy, Volume 14 (Practical Methods in Electron Microscopy). Glauert A. (ed), Elsevier Science. The Netherlands.

*Prophet, E.B., B. Mills, J.B. Arrington y L.H. Sobin (edrs). 1995. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de USA. Washington D.C.

*Ruzin, S.E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, New York, USA.

Schwarzacher, T. y J.S. Heslop-Harrison. 2000. Practical *In situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.

Sass, J.E. 1958. Botanical Microtechnique, 3a. Ed. The Iowa State College Press, Ames Iowa.

***Bibliografía con la que se cuenta en el laboratorio.**