



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Cirujano Dentista

Área Biológica

**Manual de Laboratorio del
Módulo
Biología Bucal y Bases Farmacológicas**

Fecha de aprobación por el Cuerpo Colegiado

22 de Enero de 2020

Vigente hasta 22 de Enero de 2022



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	2/185

PROFESORES PARTICIPANTES

Adriana Hernández Martínez
Axeel Becerril Ramírez
Beatriz Hernández Monjaraz
Blanca Estela Pablo Gopar
Diana María Buendía Martínez
Diego Ulises Arellano García
Erick Ricardo Ordaz Robles
Fabiola Adriana Hernández Alonso
Francisco Hernández Hernández
Gildardo Herrera Quiroz
María Elena Tejeda Rosales
Marta Elena Castro Manreza
Niria Rebeca Castro Rico
Thalía Ópalo Macías Camacho
Tomás Zepeda Muñoz
Virginia Rocha Pérez

Fecha de elaboración: 2019



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	3/185

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Objetivo	5
3. Contenido	
4.	
• Práctica 1 Manejo del Microscopio	6
• Práctica 2 Estructura bacteriana	14
• Práctica 3 Cultivo de bacterias	28
• Práctica 4 Metabolismo microbiano	40
• Práctica 5 Demostración de la actividad de la lisozima como mecanismo de defensa inespecífico	48
• Práctica 6 Fagocitosis	54
• Práctica 7 Reacciones de aglutinación	58
• Práctica 8 Formación de Biopelícula dental “ <i>in vitro</i> ”	62
• Práctica 9 Aislamiento de microorganismos de la biopelícula dental	69
• Práctica 10 Determinación del número de bacterias presentes en saliva	74
• Práctica 11 Identificación de algunos factores de riesgo para caries dental	80
• Práctica 12 Determinación de la acción desinfectante de algunas soluciones de uso común	86
• Práctica 13 Estructura eucariótica de hongos	92
• Práctica 14 Manejo de material de vidrio en el laboratorio	105
• Práctica 15 Manejo del equipo de laboratorio	112
• Práctica 16 Capacidad amortiguadora de la saliva	121
• Práctica 17 Retención de azúcares reductores en la boca	126
• Práctica 18 Identificación de aminoácidos constituyentes de la Colágena	132
• Práctica 19 Actividad de la amilasa salival	137
• Práctica 20 Análisis cuantitativo de proteínas en diente	143
• Práctica 21 Análisis cuantitativo de carbohidratos en diente	148
• Práctica 22 Análisis cuantitativo de fósforo en diente	153
• Práctica 23 Análisis cuantitativo de calcio en diente, saliva y orina	158
• Práctica 24 Análisis cuantitativo de urea en diente, saliva y orina	163
5. Criterios de evaluación	168
6. Reglamento de laboratorio	170
7. Manejo de residuos	174
8. Identificador de cambios	175
9. Anexos	178



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	4/185

INTRODUCCIÓN

El sistema de enseñanza que se lleva a cabo en la FES Zaragoza es modular, cuyo objetivo es que los profesionales se comprometan con la solución de problemas de la sociedad. Para tal meta, es necesario actuar a tres niveles: investigación (producto del conocimiento de las necesidades sociales), docencia (comunicación y confrontación práctica del conocimiento) y servicio (aplicación social de tales conocimientos) (Padilla 2012. p.73).

El sistema modular incorpora la inter-disciplina y la aplicación del conocimiento a un objeto de estudio. Entonces, este objeto de estudio será abordado conjugando diversas ciencias y técnicas con la finalidad de dar salida al problema planteado, lo cual implica que debe existir una relación entre la teoría y la práctica.

Para poder lograr la producción de conocimientos, es fundamental, buscar la información a través de experimentos y la producción de conceptos desde los productos teóricos-ideológicos existentes, las actividades que integran teoría y praxis (UAM-X, 1994). Por lo tanto, esta modalidad de trabajo facilita la vinculación de la teoría con la práctica, así como compartir, profundizar y enriquecer la experiencia personal y grupal (Guajardo 1994, p 9).

Dentro del primer año de la Carrera de Cirujano Dentista de la FES Zaragoza, existe el Módulo Biología Bucal y Bases Farmacológicas conformado por tres horas teóricas en donde se abordan temas generales de Microbiología, Bioquímica, Inmunología y Farmacología; así como dos horas prácticas.

Las horas prácticas se llevan a cabo durante el primer semestre en el laboratorio de Microbiología y en el segundo semestre dentro del laboratorio de Bioquímica. La primera parte cuenta con 13 prácticas y la segunda con 10, para hacer un total de 23 prácticas, las cuales están relacionadas directamente con los contenidos teóricos del módulo.

Este manual contiene las prácticas del módulo a fin de servir como una guía para que los estudiantes logren la vinculación de la teoría con la práctica para la producción y comprobación de su propio conocimiento. Además de los protocolos de prácticas, también contiene el objetivo del manual, el reglamento de cada uno de los laboratorios, así como el sistema de evaluación de la parte práctica del módulo.

Cada una de los protocolos de prácticas se encuentra integrado por un objetivo, fundamento teórico, material y reactivo, equipo, servicios necesarios, procedimiento, guía de interpretación de resultados con un cuestionario y bibliografía que pueden consultar como apoyo para la integración de su reporte de práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	5/185

OBJETIVO

Dirigir al alumno a la aplicación de los conocimientos adquiridos en el componente teórico del Módulo Biología Bucal y Bases Farmacológicas, proporcionando los elementos para que el Cirujano Dentista en formación, relacione el proceso salud-enfermedad en cavidad bucal con los mecanismos inmunológicos de defensa, entendiendo los procesos bioquímicos que se llevan en cavidad bucal y en la estructura dental mediante la implementación de prácticas que permitan demostrar los fenómenos ocurrido en cavidad bucal e interpretar los resultados orientándolos a aspectos relacionados con su práctica profesional.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	6/185

PRÁCTICA 1

MANEJO DEL MICROSCOPIO

OBJETIVO

Identificar las partes, función, manejo y cuidados del microscopio, para conservarlo en condiciones óptimas para el desarrollo de las prácticas de laboratorio.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Usos y aplicaciones del microscopio.

Diferentes tipos de microscopio.

Cuál es el uso del aceite de inmersión.

Comprensión de la utilidad que tiene el microscopio en el campo odontológico.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Para llevar a cabo las prácticas del laboratorio de microbiología, se requiere de la observación de microorganismos y dado que éstos no se observan a simple vista, es necesario el uso del equipo adecuado, en este caso, el microscopio como apoyo para la identificación y comprensión de los objetivos planteados para cada una de las mismas.

El microscopio es un aparato que aumenta la imagen de los objetos y permite observar aquello que, en un principio, es invisible para el ojo humano. Fue utilizado por primera vez, como tal, por el holandés Antony van Leeuwenhoek en el año 1675.

El microscopio es el instrumento más utilizado y fundamental en el Laboratorio de Microbiología puesto que proporciona la amplificación gracias a la cual el hombre es capaz de ver organismos y estructuras que a simple vista son invisibles.

Se dispone de microscopios que permiten amplias escalas de aumento; se cuenta también con varios tipos de microscopios y se han ideado muchas técnicas por las cuales las muestras de microorganismos se preparan para el examen con máximo detalle.

Cada tipo de microscopio y cada método de preparar las muestras ofrecen alguna ventaja para demostrar algunos aspectos morfológicos.

Existen microscopios simples, que emplean una sola lente y microscopios compuestos, que utilizan dos o más lentes. El alumno utilizará un microscopio compuesto, por lo que se dará una descripción de éste. (Figura 1.1)



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	7/185

Consta de varios sistemas:

1. Sistema de soporte
2. Sistema óptico
3. Sistema de ajuste
4. Sistema de iluminación

1. Sistema de soporte

Este sistema le proporciona el soporte estructural y estabilidad al equipo. Está constituido de las siguientes partes:

1.1 Brazo

Es la parte del microscopio utilizada para transportarlo. Se sostiene con la mano izquierda y por el pie con la mano derecha.

1.2 Tubo de Microscopio

Comunica y sostiene el ocular con el revólver. Se desplaza en forma vertical por medio de dos tornillos: el macrométrico y el micrométrico.

1.3 Revólver

Se comunica con el tubo del microscopio y sostiene los objetivos: Es una pieza giratoria para seleccionar el objetivo y colocarlo en una posición vertical respecto al ocular. Generalmente contiene 3 a 4 objetivos.

1.4 Platina

Es la parte donde se coloca la preparación a observar; puede tener pinzas para sostener el porta objeto o bien un carro que se maneja con un tornillo que permite el desplazamiento hacia arriba y abajo y otro tornillo que desliza a la derecha e izquierda.

1.5 Pie

Sostiene al microscopio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	8/185

2. Sistema óptico

La claridad con la que se puede ver un objeto pequeño, la determinan dos características: el aumento y el poder de resolución. El aumento es la diferencia entre el tamaño de la imagen vista con el microscopio y el tamaño real del objeto. Los mejores microscopios ópticos normalmente amplían un objeto más de 1000 veces. La resolución o poder de resolución, es la capacidad para distinguir detalles finos en una imagen; se define como la distancia mínima entre dos puntos a la cual ambos se pueden ver separados y no como un único punto borroso. El poder de resolución depende de la calidad de las lentes y de la longitud de onda de la luz de iluminación. Mientras más pequeña es la longitud de onda, la resolución aumenta.

El microscopio compuesto, consta de dos sistemas de lentes:

2.1 Ocular

Está formado por un sistema de lentes, que aumenta la imagen producida por el objetivo. Está situado cerca del ojo del observador y lleva grabado el aumento que proporciona. Algunos microscopios son monoculares y otros binoculares.

2.2 Objetivos

La resolución del microscopio, dependerá solo del objetivo. Son cuatro las clases de objetivos generalmente usados:

2.2.1 Objetivo 4X (lupa).

Es el objetivo explorador, se utiliza una visión de conjunto y para localizar estructuras grandes.

2.2.2 Objetivo 10X (seco débil).

También se llama seco débil. El área observada disminuye pero la amplificación es mayor. Se utiliza de preferencia para observar células o tejidos o bien para localizar estructuras más fácilmente y llevarlas al centro del campo para enfocarlas con el siguiente objetivo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	9/185

2.2.3 Objetivo 40X (seco fuerte).

También se conoce como seco fuerte. Se obtiene un mayor aumento y el campo se reduce, observándose los detalles de la estructura enfocada.

2.2.4 Objetivo 100x (de inmersión).

Conocido como objetivo de inmersión, ya que para su uso es necesario colocar a la preparación aceite de inmersión. Con este objetivo se obtiene una imagen más definida y más grande.

Estas dos lentes, el ocular y el objetivo, están separadas por un tubo a una distancia tal que el ocular amplifica la imagen producida por el objetivo.

La amplificación total de un microscopio, es el producto del aumento que da el objetivo (con el que se observa), y el del ocular. Así la amplificación total de los objetivos 4X, 10X, 40X y 100X y con el ocular 10X, será de 50, 100, 400 y 1000 veces respectivamente.

Por ejemplo una célula o estructura que mide 6 micras al observarla con los diferentes objetivos tendremos que:

Lupa (4X) x ocular (3X ó 5X) x 6 micras = **150 micras**.

Seco débil (10X) x ocular (5X) x 6 micras = **300 micras**.

Seco fuerte (40X) x ocular (5X) x 6 micras = **1200 micras**.

De inmersión (100X) x ocular (5X) x 6 micras = **3000 micras = 3 mm**.

Como se demuestra el incremento de la imagen ya permite al ojo humano observar detalles en la estructura microscópica.

3. Sistema de ajuste

Está constituido por dos tornillos: el macro-métrico y el micrométrico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	10/185

3.1 Tornillo macro-métrico

Permite el desplazamiento rápido y vertical del tubo del microscopio. Se localiza debajo de la platina. Se utiliza para hacer el ajuste grueso de la imagen que se desea observar.

3.2 Tornillo micrométrico

Puede estar localizado debajo del tornillo macro-métrico o ser la parte central de éste. Permite el desplazamiento lento y vertical del tubo del microscopio hasta que la imagen se aclara y queda bien definida. Se utiliza para obtener un ajuste preciso y enfocar los diferentes planos de la estructura observada.

4. Sistema de iluminación

Consta de tres partes: la lámpara, el condensador y el diafragma.

4.1 Lámpara

Consta de un foco cuya intensidad luminosa puede regularse por medio de un transformador o bien ser constante.

4.2 Condensador

En su estructura presenta un sistema de lentes que sirven para concentrar los rayos luminosos en el campo de observación.

4.3 Diafragma

Situado en la parte inferior del condensador. Está compuesto de laminillas metálicas que se abren o se cierran para regular la cantidad de luz necesaria a la observación y así lograr una imagen más definida.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	11/185

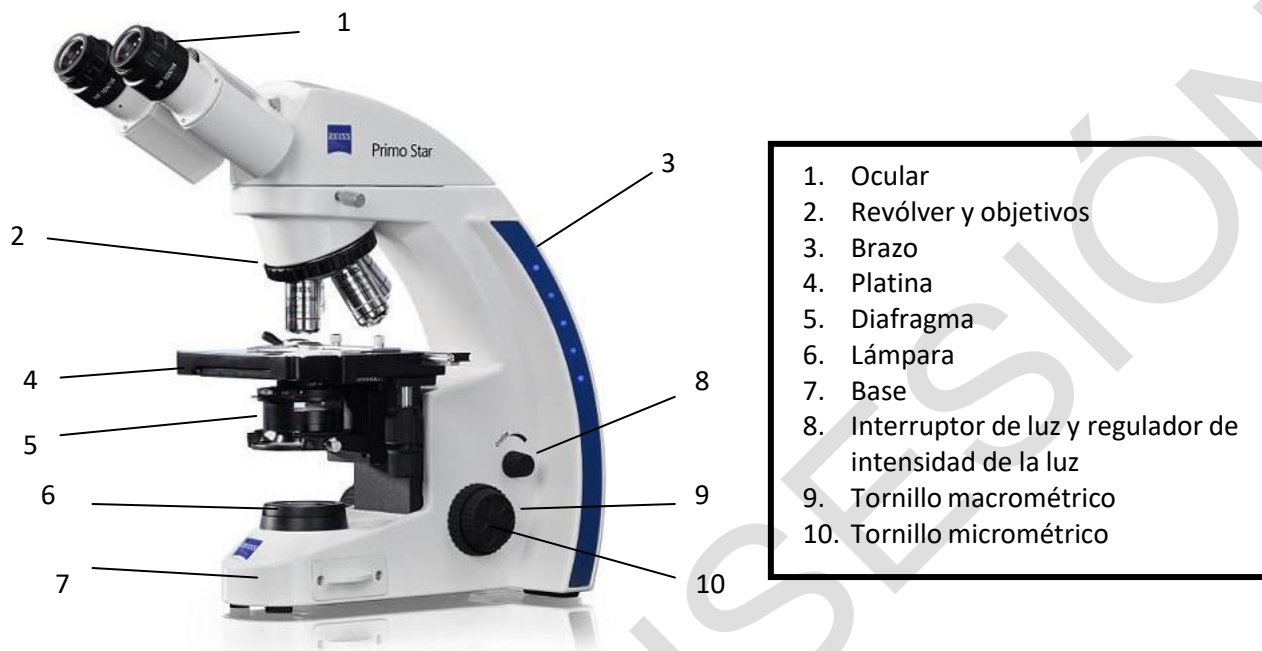


Figura 1.1 Esquematzación de las partes del microscopio compuesto.

Técnica para observar al microscopio.

- Colocar la preparación en la platina
- Ver lateralmente para bajar el tubo del microscopio con el tornillo macrométrico cerca de la preparación y utilizar el objetivo de menor aumento.
- Observando por el ocular, subir el tubo del microscopio hasta localizar el objeto de observación con el macro-métrico
- Mover lentamente el micrométrico, para precisar la imagen
- Girar el revólver para colocar el objetivo seco fuerte, observar por el ocular y detallar la imagen con el tornillo micrométrico.
- Para observar con el objetivo 100X o de inmersión, seguir los pasos siguientes:
 - Después de observar con seco fuerte (40X), gire el revólver para colocar el objetivo de inmersión y antes de concluir esta operación, colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
 - Bajar el tubo del microscopio usando el tornillo macro-métrico observando del lado hasta que el objetivo entre en contacto con el aceite de inmersión y posteriormente se ajuste el enfoque por medio del tornillo micrométrico.
 - Verificar la posición del condensador para mejorar la nitidez de la imagen.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	12/185

Cuidados del microscopio

Para una mejor observación, se requiere mantener al microscopio en perfectas condiciones mecánicas, limpio y manejarlo correctamente. Para lograr esto, hay que tener en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Si no está en uso, debe mantenerse en su estuche o funda protectora
2. Debe alejarse de la acción de ácidos y líquidos corrosivos.
3. Debe transportarse con cuidado en forma vertical y por medio del brazo y de preferencia colocando la otra mano debajo del pie.
4. Limpiarlo antes y después de usarlo, para el caso de las lentes, utilizar papel seda.
5. Al terminar la observación, colocar el objetivo de menor aumento y guardar el microscopio en su estuche o cubrirlo con su funda.

MATERIAL

1 Microscopio óptico

1 Preparación de frotis sanguíneo

1 Preparación de frotis de cocos bacterianos

1 Preparación de frotis de bacilos bacterianos

1 Preparación de letras de papel periódico

Aceite de inmersión

Papel seda

EQUIPO

Microscopio

SERVICIOS

Agua y luz



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	13/185

PROCEDIMIENTO

1. Bajo la supervisión del profesor, adiestrarse en el conocimiento del microscopio haciendo un repaso y reconocimiento de las partes del microscopio, identificando su manejo.
2. Enfocar a seco débil, seco fuerte e inmersión, las preparaciones proporcionadas
3. Después de utilizar el microscopio entregarlo al laboratorio considerando los cuidados necesarios.

RESULTADOS

Reportar los resultados obtenidos y hacer dos esquemas de cada una de las observaciones realizadas con el microscopio: una que demuestre lo observado con el objetivo 40X o seco fuerte y la otra con el objetivo de 100X u objetivo de inmersión.

CUESTIONARIO

1. Defina índice de refracción.
2. ¿Cuál es la función del aceite cuando se usa el objetivo de inmersión?
3. ¿Con cuál de los objetivos hizo una mejor observación?
4. ¿Qué aplicaciones se obtienen con el microscopio de luz?
5. Explique que es el poder de resolución de un microscopio
6. ¿Cómo se determina el grado de amplificación?; determínelo con cada uno de los objetivos que utilizó.
7. ¿Cuál es la diferencia entre resolución y aumento?
8. ¿Qué aplicación puede darle el odontólogo al microscopio en el consultorio dental?

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 25ª ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
2. Carpenter PL. Microbiología. 4ª ed. México: Interamericana; 1996
3. Douglas B. Murphy, Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. editorial Wiley-Liss, Inc., 2001.
4. Elemer W, Koneman MD. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2001.
5. Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22ª ed. México: Interamericana; 1986.
6. García-Rodríguez JA, Picazo JJ. Compendio de microbiología médica. Madrid: Harcourt Brace; 2000.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	14/185

PRÁCTICA 2

ESTRUCTURA BACTERIANA

OBJETIVO

Identificar algunos elementos estructurales de bacterias presentes en el microbioma de cavidad bucal, reconociendo que no todas las bacterias son morfológicamente iguales.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Clasificación de los seres vivos

Definición de bacteria

Componentes estructurales de las bacterias

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias son microorganismos procariontes que pueden producir alteraciones a nivel sistémico y en cavidad bucal. Se nutren principalmente por absorción, y su tipo de organización es unicelular pudiendo formar colonias.

En la célula procariota el material genético, usualmente una fibra única de DNA, se encuentra libre en el citoplasma y que no presenta membrana nuclear como los eucariontes. La membrana citoplasmática se continúa en muchas bacterias hacia el interior del protoplasto (membrana intracitoplasmática).

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal, que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico, aunado a ello, la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea imposibilita su visualización a menos que se aumente el contraste mediante la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células bacterianas o para revelar la presencia de determinados constituyentes estructurales como: flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Cápsula

Cubierta estructural altamente viscosa y firmemente adherida a la pared celular de algunas especies bacterianas, ***Streptococcus salivarius* (S. salivarius)**, produce una cápsula de polisacáridos. La cápsula protege al microorganismo de la desecación y de la fagocitosis, además puede proporcionarle la capacidad de adherirse a las superficies. El ***Streptococcus mutans* (S. mutans)** y el ***Streptococcus sanguis* (S. sanguis)**, forman un material muy parecido a la cápsula en presencia de sacarosa que permite que se adhiera a la superficie dental e inicien la formación de la biopelícula (placa) microbiana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	15/185

Pili

En bacteriología, los **pili** (singular **pilus**, que en latín significa pelo) son estructuras en forma de pelo, más finas y cortas que los flagelos que se encuentran en la superficie de muchas bacterias. Los pili corresponden a la membrana citoplasmática a través de los poros de la pared celular y la cápsula que asoman al exterior, estructura muy pequeña, delgada, rígida y recta, constituida por una proteína llamada pilina, varía en número; se asocia principalmente con bacterias Gram negativas, móviles e inmóviles y participa en el intercambio de información genética, por ejemplo con los plásmidos.

Fimbrias

Las **fimbrias** (del latín Cimbria; **fimbria** borde externo, margen, hilos, flecos), es una apéndice proteínico presente en muchas bacterias, más delgado y corto que un flagelo son utilizadas por las bacterias para adherirse a las superficies, unas a otras, o a las células animales, en muchas bacterias, las fimbrias son necesarias para la colonización durante el proceso de infección o para iniciar la formación de una biopelícula.

Flagelos

Son filamentos protéicos delicados, largos y ondulados, sirven para el movimiento bacteriano. Se originan de la membrana citoplásmica y poseen un cuerpo basal localizado en la membrana y pared celular.

Los organismos se pueden clasificar según la localización de sus flagelos:

- 1) Átrica. No presenta flagelos.
- 2) Lofótrica. Localizados en un extremo de la bacteria.
- 3) Anfítrica. Sus flagelos se localizan en los polos de la bacteria.
- 4) Perítricos. (del griego trichos, pelo) Localizados en toda la superficie del organismo.

Pared celular

Es una estructura rígida, responsable de dar forma a la bacteria y proteger a la membrana plasmática de la presión osmótica intracelular y del medio. Todas las bacterias al ser despojadas de la pared, toman una forma esférica y se llaman protoplastos. **Ver cuadro I.**



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	16/185

Pared celular	Gram positiva	Gram negativa
Complejidad	Menor	mayor
Lípidos	0-2 %	10- 20 %
Polisacáridos	35-60 %	15-20 %
Ácidos teicoicos	+	-
Lipopolisacáridos	-	+

Cuadro I. Diferencias entre la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Membrana plasmática

Es la estructura más externa de la porción viva de la célula; constituida por fosfolípidos y proteínas. Presenta selectividad y controla el paso de nutrientes y productos de desecho entre el medio y el citoplasma. Algunas enzimas respiratorias y oxidativas están asociadas con la membrana, además de las enzimas que sintetizan la pared celular.

Citoplasma

Constituye el medio interno celular. En el citoplasma puede distinguirse una parte líquida, el citosol, que es una solución cuyo solvente es el agua, mientras que los solutos constituyen una variedad de sustancias que participan en el metabolismo. En células jóvenes aparece homogéneo, en viejas es granular. En él se encuentran mesosomas, ribosomas, gránulos metacromáticos y material nuclear que se encuentran incluidos en una matriz que contiene iones, aminoácidos y proteínas, entre otros.

Mesosomas

Son invaginaciones de la membrana citoplasmática; sirven para dar sostén al material nuclear para su síntesis. Los mesosomas laterales tienen funciones excretoras y secretoras. Pueden presentar forma vesicular, concéntrica o lamelar (todo lo que está compuesto por laminillas).

Ribosomas

Son complejos articulados de proteínas y RNA (ácido ribonucleico). Responsables de la síntesis de proteínas. En las células bacterianas, se pueden disociar en subunidades 50S y 30S (grandes y pequeñas respectivamente).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	17/185

Material genético

El DNA en forma de cromatina se encuentra disperso en el citoplasma. Algunas bacterias pueden tener material extra-cromosómico en forma de

Plásmidos

Un **plásmido** es una pequeña molécula de ADN circular que a menudo se encuentran en bacterias y otras células. Los **plásmidos** son separados del cromosoma bacteriano y se replican independientemente de ella. Se hereda de forma estable, pero no es necesario ni para el crecimiento ni la reproducción de la célula que la hospeda.

Endosporas

Algunos géneros bacterianos (*Clostridium* y *Bacillus*), producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa.

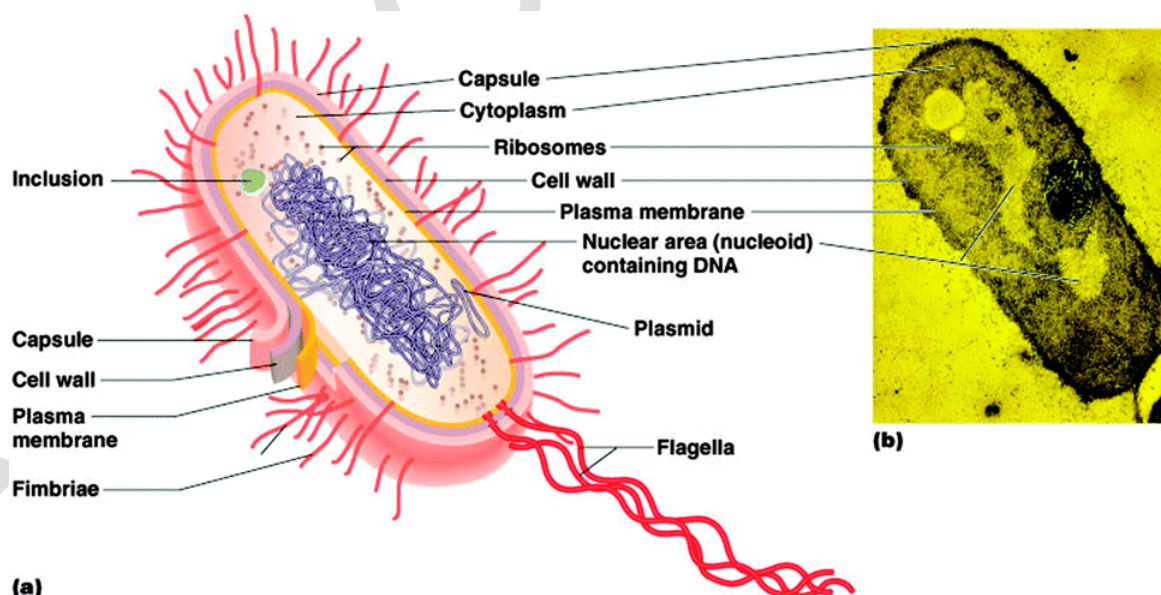


Figura 2.1 Estructura de una célula bacteriana típica (a) y una foto de microscopía electrónica de una célula bacteriana (b). Tomado de Li *et al.*, 2015.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	18/185

Tinciones

Las bacterias son incoloras y refringentes, de tal manera que se necesita el uso de tinciones para observarlas al microscopio de luz. Los colorantes además de tener la propiedad de impartir color, deben ser resistentes a la luz y al lavado, así como también la propiedad de unirse a un material por medio de una reacción química o depositarse sobre dicho material.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente (ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos).

Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente (proteínas).

Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de depósitos de grasa.



Figura 2.2 Se esquematiza la estructura de la pared celular de una bacteria Gram negativa (izquierda) y una Gram positiva (derecha).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	19/185

En el laboratorio, suelen utilizarse dos tipos de tinciones para estudiar la estructura de los microorganismos:

- Tinciones simples. Son aquellas que utilizan un solo colorante, con objeto de distinguir únicamente la forma del organismo.
- Tinciones diferenciales o compuestas. Son las que ponen de manifiesto diferencias entre las células bacterianas o partes de una célula bacteriana.

La retención de determinados colorantes por las bacterias depende grandemente de la estructura celular de la bacteria, principalmente de la pared celular.

En la técnica de tinción de Gram, se utilizan dos colorantes, por tanto, es un método de tinción diferencial. Esta técnica, divide a las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo con la estructura de su pared (Figura 2.2): las bacterias Gram negativas, que toman el colorante de contraste que es la safranina y las bacterias Gram positivas, que toman el colorante primario, el cristal violeta (**Cuadro II**).

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Bacteroides oralis</i>
<i>Corinebacterium diptheriae</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Nocardia spp</i>	<i>Vellonella alkalescens</i>
<i>Peptococcus spp</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Peptostreptococcus spp</i>	<i>Neisseria spp</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>	
<i>Streptococcus mitis</i>	
<i>Streptococcus mutans</i>	
<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>Streptococcus sanguis</i>	

Cuadro II. Microorganismos Gram positivos y Gram negativos de mayor importancia en cavidad bucal.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	20/185

El procedimiento de la tinción de Gram se inicia con la tinción de las células bacterianas previamente fijadas al calor, con el colorante básico, cristal violeta. Posteriormente, la adición de lugol genera un precipitado con el cristal violeta, que está en gran parte aislado en la malla de peptidoglicano de la pared bacteriana. El lavado con alcohol/acetona, extrae los lípidos de la pared celular de la célula Gram (-), aumentando la porosidad lo que permite que el precipitado sea eliminado; por el contrario, el peptidoglicano de la célula Gram (+) intacta, retiene el precipitado dentro de la célula. Finalmente, la tinción de contraste permite visualizar las bacterias Gram (-) que perdieron el colorante primario, usando safranina como colorante secundario. (Figura 2.3)

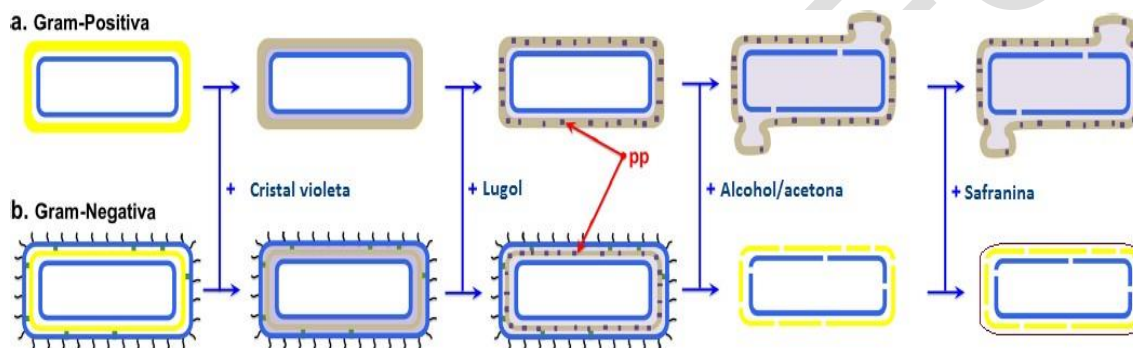


Figura 2.3 Esquema del mecanismo molecular del protocolo de tinción de Gram para secciones transversales de bacterias Gram (+) y Gram (-). Tomado y modificado de Wilhelm *et al.*, 2015.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cepas bacterianas:

Bacillus anthracis

Bacillus subtilis

Corynebacterium sp

Klebsiella pneumoniae

Staphylococcus aureus

Streptococcus mutans



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	21/185

Colorantes:

Alcohol-acetona

Colorante de Albert

Cristal violeta

Fucsina

Lugol (Yodo de Gram)

Mordiente de cápsula

Mordiente de Knaysi

Rojo congo

Safranina al 0.5 %

Tinta china

Verde de malaquita al 5 %

Material

Portaobjetos

Cubreobjetos

Asa bacteriológica

Aplicador

Mechero bunsen

Pinzas de disección

EQUIPO

Microscopio

Refrigerador

SERVICIOS

Electricidad, agua y gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	22/185

PROCEDIMIENTO

Preparación del frotis para tinción de Gram

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Klebsiella pneumoniae***.
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y repetir el procedimiento con ***Staphylococcus aureus*** y colocarlo en la misma gota de agua con muestra de ***Klebsiella pneumoniae*** con el fin de realizar una mezcla bacteriana de Gram (+) y Gram (-).
5. Esterilizar el asa al terminar.
6. Fijar el frotis por calor directo, pasando el portaobjetos por la flama del mechero 2 ó 3 veces (sin calentar mucho).

Tinción de Gram

1. Agregar **cristal violeta** al portaobjetos de manera que el frotis se cubra perfectamente y dejar actuar por 60 segundos.
2. Lavar con agua de la llave, procurando que no pegue de lleno el agua sobre la preparación.
3. Agregar **Lugol** a la preparación y dejar actuar por 60 segundos.
4. Lavar con agua corriente, retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos.
5. Agregar **alcohol – acetona** a la preparación y dejar actuar por 30 segundos.
6. Lavar con agua corriente y retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos.
7. Colocar **safranina** cubriendo completamente la preparación por 30 segundos.
8. Lavar con agua corriente, retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos y secar al aire.
9. Colocar el portaobjetos en el microscopio y ubicar la preparación a 10x y 40x.
10. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.
 - Bacterias de color moradas se consideran Gram (+), bacterias de color rosa se consideran Gram (-).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	23/185

Demostración de cápsula

Método de tinta china – frotis húmedo

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado coloque 1 gota de agua.
2. Trabajando cerca del mechero, esterilizar el asa bacteriológica por calor directo y tomar una muestra de ***Klebsiella pneumoniae***, haciendo una suspensión.
3. Colocar a un lado, una gota de tinta china.
4. Homogenizar con el asa, y esterilizar, colocar encima un cubreobjetos y presionar con un fragmento de papel secante.

Si el cubreobjetos no es presionado suficientemente, los microorganismos tienden a ser conducidos a todas direcciones por la tinta y pueden ser enmascarados por las capas de tinta, si se presiona demasiado, las cápsulas pueden distorsionarse.

5. Observar en los objetivos 10x y 40x.
6. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar a 100x.
 - Las cápsulas aparecen como zonas claras entre el contorno de las células y el fondo oscuro.

Demostración de cápsula

Método de rojo congo

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado coloque 1 gota de colorante rojo congo.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar el asa bacteriológica por calor directo y tomar una muestra de ***Klebsiella pneumoniae***, haciendo una suspensión y posteriormente esterilizar el asa bacteriológica.
3. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama del mechero 2 ó 3 veces (sin calentar mucho).
4. Adicionar mordiente de cápsula y dejar actuar por 2 minutos.
5. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
6. Observar en los objetivos de 10x y 40x.
7. Colocar una gota de aceite de inmersión y observar a 100x.
 - Las cápsulas aparecen como una zona clara entre el contorno de la bacteria de color rojo en un campo azul oscuro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	24/185

Demostración de pared celular

Técnica de Knaysi

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Bacillus anthracis***.
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica.
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama del mechero 2 ó 3 veces (sin calentar mucho).
6. Colocar mordiente de Knaysi durante 10 minutos.
7. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
8. Colocar una gota de fucsina e inmediatamente colocar un cubreobjetos, procurando la no formación de burbujas de aire.
9. Observar la preparación a 10x y 40x.
10. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar a 100x.
 - La pared se observa brillante bien delimitada alrededor de la bacteria.

Demostración de gránulos metacromáticos

Técnica de Albert

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Corynebacterium sp.***
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica.
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama.
6. Cubrir el frotis con colorante de Albert durante 5 minutos.
7. Con la ayuda de unas pinzas de disección pasar el portaobjetos por el mechero para calentar la preparación por 30 segundos. No permitir que hierva el colorante.
8. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
9. Aplicar solución de lugol durante 1 minuto.
10. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	25/185

11. Observar la preparación a 10x y 40x.

12. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.

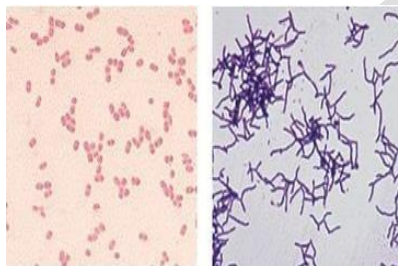
- Los gránulos metacromáticos aparecen de color azul oscuro y el citoplasma verde pálido.

Demostración de endosporas

Técnica de Schaeffer-Fulton

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de *Bacillus subtilis*.
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica.
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama.
6. Cubrir la preparación con solución verde de malaquita al 5 % y con la ayuda de una pinza de disección, calentar hasta la formación de vapores durante 1 minuto.

TINCIÓN DE GRAM



Gram-negativo

Gram-positivo

TINTA CHINA



Cápsulas

ROJO CONGO



Cápsulas

KNAYS



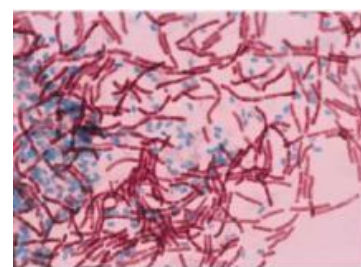
Pared celular

ALBERT



Gránulos metacromáticos

SCHAEFFER-FULTON



Endosporas



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	26/185

7. Lavar con agua corriente y agitar para retirar el exceso.
8. Adicionar solución acuosa de safranina al 0.5 % durante 30 segundos.
9. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
10. Observar la preparación a 10x y 40x.
11. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.
 - Las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma rojo.

RESULTADOS

Reportar los resultados de cada tinción mediante fotografías o esquemas a color, señalando las estructuras observadas.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es un mordiente y cuál se utiliza en la técnica de Gram?
2. Definir qué es un colorante.
3. ¿Cuál es el colorante primario utilizado en la técnica de Gram? ¿Puede ser sustituido por otro colorante?
4. ¿En qué se basa la técnica de Albert y cuál es su utilidad?
5. ¿Cuáles son las diferencias principales entre bacterias Gram (+) y Gram (-)?
6. ¿Qué estructuras son utilizadas para la identificación de una bacteria?
7. ¿Qué función tienen las esporas?
8. ¿Qué función tienen la cápsula
9. ¿Qué función tiene la pared celular?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	27/185

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks, G. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica 25a. México McGraw Hill. 2011, 11-13
2. Curtis H., Barnes S., Schnek A. y Massarini A. (2008) Biología. 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
3. Li F, Collins JG, Keene FR. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. Chem Soc Rev. 2015; 44(8): 2529-42.
4. Liébana, J. Microbiología oral. *Granada: Mc Graw Hill Interamericana*. 2002. 22-24
5. Negroni, M. Microbiología estomatológica. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2000: 481-488
6. Nolte, WA. Microbiología odontológica. México Editorial Interamericana, SA. 1971, 19-46
7. Wilhelm MJ, Sheffield JB, Sharifian GM, Wu Y, Spahr C, Gonella, *et al*. Gram's stain does not cross the bacterial cytoplasmic membrane. ACS chemical biology, 2015; 10(7), 1711-1717.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	28/185

PRÁCTICA 3 CULTIVO DE BACTERIAS

OBJETIVO

Identificar los diferentes medios de cultivo *in vitro* dependiendo de su consistencia y componentes químicos a través de las diferentes técnicas de siembra, para establecer una relación *in vivo*.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Requerimientos nutricionales de las bacterias

Concepto de medio de cultivo y tipos

Concepto de pH y su relación con el crecimiento bacteriano

Influencia de la temperatura en el crecimiento bacteriano

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos son parte de la microbiota presente en todos los organismos, sin embargo muchos de ellos son agentes etiológicos de diversas patologías. Debido a lo anterior, es importante conocer las características de nutrición, crecimiento y fisiología de los mismos; en esta práctica se revisarán los medios de cultivo óptimos para el crecimiento bacteriano a partir de técnicas específicas de laboratorio microbiológico.

Los microorganismos y su relación con las enfermedades infecciosas pueden ser conocidas a través de técnicas específicas de laboratorio microbiológico. Para el crecimiento se requieren de nutrientes y condiciones específicas; ya que muchos de los microorganismos pueden sintetizar sus componentes orgánicos a partir de fuentes de carbono simples, mientras que otros requieren de fuentes más complejas para crecer. Debemos recordar que se debe mantener en equilibrio a las bacterias patógenas y no patógenas.

Existen nutrientes esenciales para los organismos que son metabolitos que no pueden sintetizar por ellos mismos y que por lo tanto tienen que provenir de fuentes externas proporcionados con los medios de cultivo.

Sólo las bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y protozoarios pueden crecer por medios de cultivo artificiales, es decir *in vitro*, mientras los virus, rickettsias, y clamidias requieren de cultivos *in vivo* (de células vivas como embrión de pollo o animales) para su crecimiento y reproducción



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	29/185

Clasificación de microorganismos

Los microorganismos son clasificados de acuerdo a diferentes características como tipo de nutrientes, temperatura, pH y requerimientos de oxígeno.

Para su nutrición, crecimiento y reproducción, cada organismo requiere de diferentes nutrientes dependiendo de sus sistemas enzimáticos, por lo cual de acuerdo a su forma de nutrición se clasifican en:

- 1- **Autótrofos**: Viven y se multiplican en un ambiente inorgánico, poseen sistemas enzimáticos que los hacen capaces de metabolizar sustancias inorgánicas para formar sus componentes celulares. Algunos son fotosintéticos y otros quimiosintéticos.
- 2- **Hipótrofos**: Requieren de células vivas para poder crecer, ya que han perdido los sistemas enzimáticos para reproducirse por los que son parásitos obligados.
- 3- **Heterótrofos**: Requieren de materia orgánica preformada para la síntesis de sus componentes celulares. Aquí se incluyen los microorganismos de la flora normal humana.

Otro factor que influye también en el crecimiento de los microorganismos, es la **temperatura** y pueden clasificarse de acuerdo a la temperatura óptima que requieren para poder crecer en:

- a. Psicrófilos. Son los microorganismos que crecen a temperaturas menores de 20°C, ya que en temperaturas mayores se van perdiendo componentes celulares ya que se altera su membrana.
- b. Psicrófilos facultativos. Especies que crecen a una temperatura de entre 20 y 0°C.
- c. Mesófilos. Son los microorganismos que tienen sus temperaturas óptimas de crecimiento entre 25 y 40°C. Muchos de los microorganismos mesofílicos que causan enfermedad, tienen las óptimas entre 35 y 37°C.
- d. Termófilos. Presentan temperaturas óptimas de crecimiento entre 50 y 60°C, no son de importancia para la salud humana, se encuentran en el suelo.
- e. Hipertermófilos. Algunos organismos pueden crecer a 90°C o más, incluso, algunos pueden crecer hasta a 113°C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	30/185

El pH (grado de acidez o alcalinidad) del medio, es un factor que también influye de manera importante en el crecimiento de los microorganismos. Muchas bacterias patógenas, crecen a un pH ligeramente por encima del neutro ($\text{pH} = 7$) (neutrófilos). Otros como lactobacilos, cándida, y hongos en general, crecen mejor a un pH de 5 (ácido) (acidófilos). Mientras otros crecen a un pH alto (basófilos).

El oxígeno es otro factor importante para el crecimiento bacteriano, con base a su relación con el oxígeno, las bacterias se clasifican en:

- Bacterias anaerobias: crecen en ausencia de oxígeno, emplean como aceptor electrónico alguna otra molécula en lugar de oxígeno.
- Bacterias aerobias: Requieren de oxígeno para su crecimiento, ya que utilizan el oxígeno molecular como último aceptor de electrones en sus dadores orgánicos
- Bacterias facultativas: Crecen en presencia o ausencia de oxígeno (aerobias o anaerobias).
- Bacterias anaerobias estrictas: Estas bacterias no crecen en presencia de oxígeno, el cual es muy tóxico y causan la muerte de estas bacterias.

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato requerido en el laboratorio microbiológico para el crecimiento bacteriano, el cual consta de un gel o de una solución que contiene los nutrimentos necesarios, en condiciones de pH, grado de humedad, presión de oxígeno y temperatura que permite el crecimiento de microorganismos. Todo medio de cultivo consta de una fuente de carbono para construir los esqueletos de las moléculas y aportar energía; una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas y una fuente de hidrógeno.

El crecimiento microbiano es exponencial, mientras no disminuyan las fuentes de nutrientes y en cuanto esto sucede, el crecimiento se hace más lento, llegando a una fase estacionaria, para seguir con una fase de declinación o muerte. Lo anterior se puede demostrar mediante una curva de crecimiento:

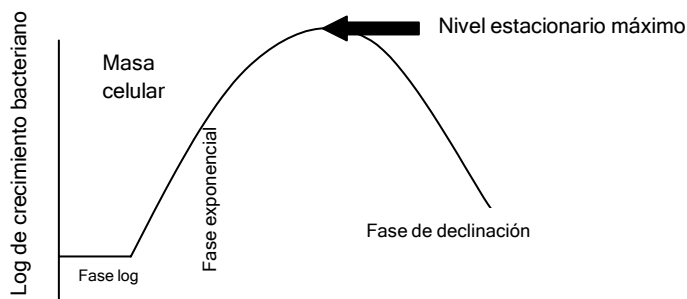


Figura 3.1 Curva de crecimiento microbiano.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	31/185

Para su estudio se pueden clasificar de acuerdo a su composición química, usos y consistencia.

Clasificación de medios de cultivo por su composición química

Medios naturales: Se obtienen a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como carne, vísceras, leche, papa, entre otros, por ello su composición no puede ser constante, varía de un organismo a otro.

Medios sintéticos: Son aquellos en los que sus componentes están químicamente definidos cuyos nutrientes permiten el desarrollo de microorganismos no exigentes en cuanto a su requerimiento nutricional por ejemplo agar nutritivo.

Medios semisintéticos: También llamados empíricos son aquellos medios a los cuales se les agregan nutrientes naturales de origen natural, animal, vegetal o de otros microorganismos por ejemplo papa, extracto de carne o de verdura lo que hace que su composición sea exacta variando de un lote a otro son los de mayor uso en el laboratorio, por ejemplo agar sangre, caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés).

Clasificación de medios de cultivo por sus usos

Medios simples: Son los que constan de todas las fuentes nutritivas mencionadas en forma de compuestos simples.

Ejemplo: Caldo nutritivo, agar nutritivo.

Medios ricos: Constan de fuentes nutritivas complejas. Están enriquecidos con tejidos orgánicos como sangre, extracto de carne, líquido de ascitis. En ellos

Pueden crecer mayor cantidad de bacterias en los medios simples, especialmente de difícil crecimiento.

Ejemplo: Agar sangre, agar soya tripticasa.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	32/185

Medios de enriquecimiento: Por lo general se trata de medios líquidos; contienen además fuentes nutritivas complejas, agentes selectivos para un tipo de microorganismos.

Ejemplo: Caldo selenita, que sirve para enriquecer una muestra sospechosa de Salmonella; contiene selenito de sodio que es un tóxico para bacterias de otros géneros.

Medios especiales: Son medios a los cuales se les adiciona factores de crecimiento como vitaminas, hemina, entre otros, los cuales son necesarios para el crecimiento de determinados microorganismos.

Ejemplo: Medio de Levinthal.

Medios diferenciales: Son medios que revelan características específicas, sin inhibir el crecimiento de algún microorganismo son muy útiles para identificación de bacterias.

Ejemplo: EMB, Endo, MacConkey, agar sangre.

Medios selectivos: los microorganismos que existen en la población, pueden ser separados favoreciendo su crecimiento por inhibición de otros mediante la adición de sustancias inhibitoras o pH, entre otros

Ejemplo: estafilococo 110 (S110) para estafilococos, agar rogosa para lactobacilos, agar *mitis salivarius* para estreptococos.

Clasificación de medios de cultivo por su consistencia

Medios líquidos. Permiten el estudio del crecimiento bacteriano en términos de masa celular, lo cual se puede evidenciar por turbidez a simple vista o por medio de un fotocolorímetro.

Medios sólidos. Estos medios constan esencialmente de agar, gelatina o albúmina. El agar es un polisacárido extraído de varias algas rojas, contiene galactosa con un derivado sulfatado. El agar es una sustancia ideal para hacer medios sólidos, ya que a una concentración de 1.5 a 2% no es tóxico para las bacterias, la superficie del agar es lo suficientemente húmeda para soportar el crecimiento y lo suficientemente seco para mantener las colonias separadas. Sólo los microorganismos móviles como *Proteus* requieren de 5% de agar. Los usos del medio sólido son: contar células viables, aislamiento, diferenciación e identificación de microorganismos.

Medios semisólidos: Contienen de 1 a 1.5 % de agar. Son especialmente útiles para observar movilidad y para conservar vivas las cepas de los cultivos por largos periodos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	33/185

Ejemplos de medios de cultivo

Agar nutritivo.

Contiene extracto de carne, (pulverizado que brinda hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, vitaminas hidrosolubles, levadura y sales), peptona (obtenida como producto de la digestión de sustancias proteicas sirve como fuente de carbono, nitrógeno y energía) y agar, (da solidez al medio de cultivo se obtiene de algas marinas y no sirve como nutriente ya que es resistente a la hidrólisis bacteriana que generalmente se agrega a los medios de cultivo en concentraciones de 1 al 2%. Se usa como medio de cultivo general para la mayoría de las bacterias no demasiado exigentes como agar base. Este medio se vende ya preparado y deshidratado; para utilizarlo es necesario resuspender 23grs. de medio en 1000ml de agua destilada y calentar hasta completa disolución y dejar hervir un poco. Se esteriliza y se vacía a placas o tubos.

Agar sangre.

Contiene infusión de corazón, triptosa, cloruro de sodio, agar y sangre de carnero. (Aporta factores de crecimiento). Se prepara un medio base al cual se le adiciona sangre de carnero con el objeto de cultivar bacterias más exigentes, patógenas. El crecimiento en éste medio es generalmente exuberante y en él se puede observar diferentes grados de hemólisis, que es característica diferencial de algunos organismos. Para prepararse se resuspenden 40 grs. De medio base deshidratado en 1000ml. De agua destilada y calentar a ebullición para disolver el medio. Esterilizarlo y dejarlo enfriar a aproximadamente a 45- 50°C, agregar sangre desfibrinada en condiciones asépticas en proporción del 5%.

Agar Endo.

Contiene peptona, lactosa, fosfato dipotásico, agar, sulfato de sodio fucsina básica. Es un medio diferencial utilizado para bacterias intestinales (coliformes).

Se usa en el diagnóstico de enfermedades intestinales para aislar agentes patógenos y en Microbiología Sanitaria.

La fucsina se usa como indicador para diferenciar los organismos fermentadores de la lactosa de los no fermentadores. Los organismos que son fermentadores de la lactosa aparecen como colonias blancas o incoloras y las que la fermentan dan colonias rosas.

Medio Estafilococo 110

Contiene extracto de levadura, triptona, gelatina, lactosa, manitol cloruro de sodio, fosfato dipotásico, este agar es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos. La selectividad



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	34/185

de éste medio consiste en su alta concentración de cloruro de sodio, la cual no soportan los demás microorganismos.

Medio SIM

Contiene extracto de carne, peptona, hierro peptonizado, tiosulfato de sodio y agar. Se utiliza como medio de rutina para la identificación de miembros de los medios de **Salmonella y Shigella**, por la producción de ácido sulfhídrico, indol y movilidad. Estas características junto con otras son importantes para la identificación de miembros Gram negativos del grupo entérico. Este medio es semisólido, para permitir la movilidad de organismos flagelados; la identificación del ácido sulfhídrico se identifica por un precipitado de color negro y la producción de indol se identifica por la adición del reactivo de Kovacs o de Ehrlich: el color rojo indica producción de indol.

MATERIAL POR EQUIPO

1 Paquete con 3 hisopos estériles

Asa y porta asa

Mechero

Cepas:

1 Tubo con agar simple con ***Staphylococcus aureus***

1 Tubo con agar simple con ***Klebsiella pneumoniae***

1 Tubo con agar simple con ***Escherichia coli***

1 Caja con agar EMB (Eosina azul de metileno)

1 Caja con agar sangre

1 Caja con agar estafilococo 110

1 Caja con agar simple

1 Tubo con agar simple inclinado

1 Tubo con caldo nutritivo

1 Tubo con medio SIM

Reactivo de Kovac

Equipo

Refrigerador, incubadora



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	35/185

SERVICIOS

Agua, luz y gas

PROCEDIMIENTO

1. Con diferentes hisopos estériles, se tomaran las siguientes muestras y sembrar por el método de estría cruzada (Figura 3.2) como sigue:

Exudado faríngeo Sembrar en agar sangre

Exudado faríngeo Sembrar en agar estafilococo 110

Exudado de mano Sembrar en agar simple

Escherichia coli Sembrar en agar EMB (Sembrar con asa bacteriológica)

1. Tomar la muestra con el hisopo y depositarla en la parte superior de la caja, sembrando masivamente hasta cubrir la mitad de la caja

2. Quemar el hisopo y desecharlo en la basura

3. Con el asa previamente esterilizada y enfriada, realizar el segundo cuadrante de estrías, tomando solo una vez parte de la muestra colocada en el segmento anterior.

4. Esterilizar el asa, enfriar y hacer el tercer cuadrante de estrías, sin tocar el primer cuadrante. Incubar durante 24 horas a 37°C.

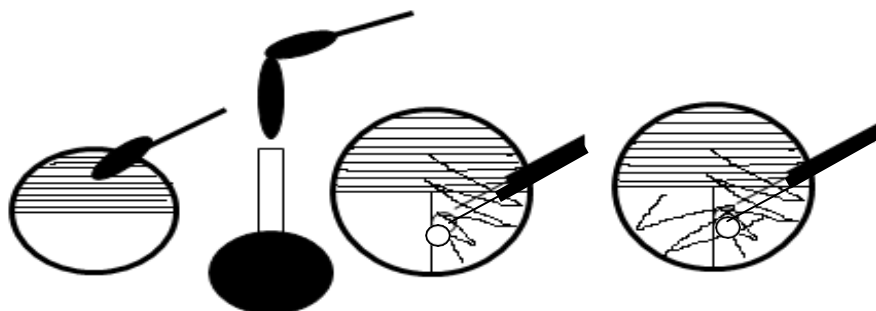


Figura 3.2 Esquematización de la técnica de estría cruzada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	36/185

2. A partir de cultivos puros de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* hacer resiembras en tubos con agar simple inclinado (sólido), caldo simple (líquido) y medio SIM (semisólido) como sigue:

Nota: Primeramente hay que asegurarse de que los tubos no tienen los tapones pegados, girando suavemente y destaparlos cerca del mechero. Deben marcarse con la cepa que se va a sembrar y la fecha.

A) Siembra en medio inclinado (Agar simple)

1. Esterilizar el asa a la flama del mechero hasta que se ponga al rojo vivo.
2. Enfriar el asa cerca del mechero o bien sumergiéndola en un trozo de agar no sembrado.
3. Tomar una asada del cultivo de *Staphylococcus aureus* y sembrar por estría simple, deslizando el asa desde el fondo del medio. (Figura 3.3)
4. Al terminar la siembra, esterilizar el asa.
5. Incubar a 37°C. durante 24 horas.

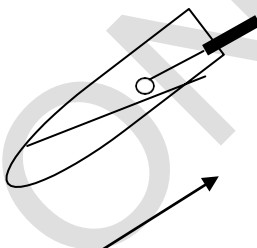


Figura 3.3 Técnica de siembra por estría simple en medio inclinado

B) Siembra en caldo

1. Repetir los pasos 1 y 2 del inciso A
2. Tomar una asada del cultivo de *Staphylococcus aureus* y sembrar el caldo mediante agitación del asa dentro de él. (Figura 3.4)
3. Esterilizar el asa.
4. Incubar a 37°C. durante 24 horas.

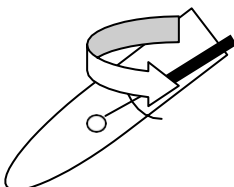


Figura 3.4 Técnica de siembra por agitación en medio líquido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	37/185

C) Siembra por picadura (Medio SIM)

1. Realizar los pasos 1 y 2 del inciso A
2. Con el asa totalmente recta, tomar una asada de *Klebsiella pneumoniae* y sembrar en el tubo con medio SIM en posición vertical, tratando de meter y sacar el asa por el mismo lugar para que la picadura quede recta. (Figura 3.5)
3. Esterilizar el asa
4. Incubar a 37°C. durante 24 horas. (Agregar reactivo de Kovac's en el momento de leer frente a mechero)

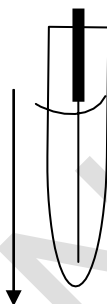


Figura 3.5 Técnica de siembra por picadura en medio líquido.

Realizar la lectura de la Morfología Colonial que presenten las bacterias en los siguientes medios de cultivo: Agar sangre, estafilococo 110, EMB y agar simple.

Leer tamaño de las colonias, color, forma, elevación, bordes, superficie, textura, y solo en el medio de agar sangre reportar tipo de hemólisis. Observar y reportar los cambios obtenidos en los tubos con medios de cultivo ya sembrado.

RESULTADOS

- a. Realizar esquemas de cada una de las técnicas de sembrado que realizó, especificando la utilidad de cada una
- b. Hacer una tabla como la sugerida a continuación de la morfología colonial bacteriana observada en los diferentes medios de cultivo. **(Ver anexo 1)**



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	38/185

	Agar sangre	Agar S-110	Agar nutritivo	Agar EMB
Tamaño				
Color				
Forma				
Elevación				
Borde				
Superficie				
Textura				
Hemólisis		---	---	----

---- No presenta

- c. Contesta (+) positivo o (-) negativo para las características de crecimiento en los siguientes medios de cultivo.

Caldo nutritivo

Crecimiento _____

Descripción:

Agar nutritivo inclinado

Crecimiento _____

Descripción:

SIM

Ácido sulfhídrico _____

Indol _____

Movilidad _____



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	39/185

CUESTIONARIO

1. Definir el concepto de medio de cultivo
2. Mencione tipos de cultivo según su composición y defina cada uno
3. ¿Qué clase de nutrientes proporciona cada uno de los ingredientes del caldo y agar nutritivo?
4. ¿Qué objeto tiene la regulación del pH en los medios de cultivo?
5. ¿Qué es una colonia bacteriana?
6. ¿Qué significa esterilización?
7. ¿Qué es un cultivo puro?
8. De las técnicas que utilizó ¿Cuál emplearía para aislar microorganismos de cavidad bucal?

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana-Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed., Madrid España: Mc Graw Hill; 2002.
2. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2ª ed., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2014.
3. Murray PR, Rosenthal KS y Pfaller MA. Microbiología Médica. 7ª ed., Madrid España: Elsevier, 2006.
4. Bailón LL, Cruz -González MR y Cervantes SA. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. México: UNAM, 2004
5. Prescott, L., Harley, J. y Klein. D. Microbiología. 4ª ed., Madrid España: McGraw-Hill Interamericana, 2000.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	40/185

PRÁCTICA 4

METABOLISMO MICROBIANO

OBJETIVO

Comparar el metabolismo bacteriano a través de diferentes reacciones para el reconocimiento de procesos, características e identificación microbianas.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Definición de metabolismo, catabolismo y anabolismo
2. Definición de enzima y sustrato
3. Importancia de las enzimas en las reacciones metabólicas

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de la fisiología bacteriana permite comprender el funcionamiento de los procesos bacterianos y sus reacciones, los cuales pueden tener repercusión en el organismo causando alteraciones a diversos tejidos. Las bacterias al igual que todos los seres vivos tienen requerimientos naturales y condiciones de crecimiento específico, para ello requieren llevar a cabo reacciones de asimilación y desasimilación conocidas como metabolismo.

La utilización de oxígeno o dióxido de carbono por parte de las bacterias conocidas como oxidaciones biológicas, permiten clasificarlas en dos grandes grupos, a aquellas que utilizan el oxígeno como aceptor son conocidas como aerobias y los que sobreviven en presencia de bióxido de carbono se llaman anaerobios.

Los carbohidratos se utilizan para la síntesis de sustancias celulares y la conversión a glicógeno como reserva alimenticia formando gránulos para la degradación de carbohidratos a través de la glucólisis y la vía de Embden-Meyerhoff en la cual la glucosa se convierte en ácido pirúvico y es degradado a bióxido de carbono y agua por el Ciclo de Krebs obteniéndose durante este proceso 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En condiciones anaerobias la glucosa no se oxida completamente, sino que se obtiene productos finales como ácido láctico, acético, propiónico y alcohol entre otros (fermentación).

Cuando se trata de proteínas el proceso de degradación es conocido como proteólisis. Las enzimas proteolíticas son factores de invasividad muy importantes ya que la composición de los tejidos y las sustancias intercelulares es principalmente proteica como en el caso de la colágena que rodea la raíz de los órganos dentarios y un microorganismo proteolítico que produzca la enzima colagenasa puede dar como resultado movilidad, pérdida de los dientes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	41/185

Prueba	Explicación	Ejemplos
Metabolismo de carbohidratos Sacarosa y Glucosa	La fermentación es un proceso metabólico de óxido-reducción. Las bacterias, por lo general anaerobias facultativas, degradan los carbohidratos a dos moléculas de carbono (triosas) ácidos. Se utiliza un medio caldo de sacarosa o glucosa más rojo fenol (indicador de pH). Las bacterias que metabolizan estos carbohidratos, producen ácidos, los cuales producen un descenso de pH y el medio vira a color amarillo. Azúcar + Rojo fenol + bacterias $\rightarrow$ H₂CO₂ (ácidos)	Glucosa <i>Escherichia coli</i> (+), <i>Streptococcus mutans</i> (+) Sacarosa <i>Escherichia coli</i> (-), <i>Streptococcus mutans</i> (+)
Actividad de la catalasa	La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (se observa burbujeo). Es necesario tener cuidado de no tomar colonias bacterianas con sangre ya que puede dar un falso positivo.	<i>Staphylococcus</i> (+), <i>Streptococcus</i> (-), <i>Bacillus</i> (+), <i>Clostridium</i> (-)
Degradación de leche tornasol	En este medio permite diferenciar organismos gracias a las múltiples reacciones metabólicas que se llevan a cabo sobre la base de un medio láctico. El tornasol es un indicador de pH y de óxido-reducción que indica diversas funciones metabólicas: Fermentación de lactosa: Se forma ácido láctico de la degradación de la lactosa que se observa de color rosa. En ocasiones no fermenta pero se metaboliza liberando amoníaco con un pH alcalino y el medio se observa púrpura azulado. Lactosa $\rightarrow$ glucosa + galactosa Glucosa $\rightarrow$ Ácido láctico $\searrow$ Ácido butírico Reducción del tornasol: Algunos microorganismos reducen el tornasol a una leucobase que provoca el cambio a color blanco. Formación de coágulo Las enzimas proteolíticas de los microorganismos hidrolizan las proteínas de la leche que forma un coágulo a causa de la renina que precipita a la caseína. Caseína (leche) $\rightarrow$ paracaseína Renina Ca⁺⁺ Peptonización Se lleva a cabo por la caseinasa que provoca hidrólisis de la caseína formando un precipitado caseinógeno que se observa como un líquido claro.	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	42/185

	Formación de gas Como resultado de la fermentación, se libera CO ₂ e H ₂ pero solo se puede observar si se coloca una campana de Durham en donde se observa producción de burbujas. Lactato → CO ₂ + H ₂ (gases)	
Producción de ureasa	En el medio de Urea de Christensen, las bacterias hidrolizan la urea para convertirla en dos moléculas de amoníaco a través de la ureasa. Su contenido de rojo fenol permite observar el cambio de color a rosa intenso cuando la prueba es positiva. $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_3 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{CO}_2$ ureasa	<i>S. aureus</i> (-), <i>Proteus</i> (+), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (-), <i>Shigella</i> (-), <i>Echerichia</i> (-)
Detección de ácido sulfhídrico, indol y movilidad (SIM)	S (ácido sulfhídrico) Algunas bacterias utilizan el tiosulfato sódico en la cadena transportadora reduciéndola a ácido sulfhídrico, éste reacciona con el hierro presente en el medio, formando sulfuro de hierro gracias a la actividad de la cisteinasa, dando como resultado un precipitado negro. Bacteria + Tiosulfato de sodio → H ₂ S H ₂ S + citrato férrico → Sulfuro ferroso I (indol) Se emplea para detectar la presencia de enzima triptofanasa que degrada al triptófano y produce indol, ácido pirúvico y NH ₃ ⁺ . Se requiere reactivo de Kovac, el cual contiene para-dimetilaminobenzaldehído que reacciona con el indol, produciendo rosindol en forma de anillo rojo. $2\text{-Triptofano} \rightarrow \text{Indol} + \text{Ác. Pirúvico} + \text{NH}_3^+$ Indol + para-dimetilaminobenzaldehído → Rosindol Reativo de Kovacs M (movilidad) Se juzga por una zona difusa de crecimiento que emana de la línea de inoculación debido a los flagelos de bacterias, principalmente bacilos.	<i>Salmonella typhi</i> (+), <i>Escherichia coli</i> (-) <i>Salmonella typhi</i> (-), <i>Enterobacter</i> (-), <i>Klebsiella</i> (-), <i>E.coli</i> (+) <i>Salmonella typhi</i> (+), <i>E. coli</i> (+/-)
Oxidación y Fermentación de Glucosa (Hugh-Leifson con manitol)	La oxidación se lleva a cabo en un medio aeróbico (sin sello de nujol) mostrando cambio de color en el tercio superior del medio. La fermentación es un proceso anaeróbico que se lleva a cabo en un medio con sello de nujol, en donde se determina positiva la prueba cuando cambia la totalidad del medio	



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	43/185

Citrato de Simmons	Indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. El medio contiene citrato de sodio como fuente de carbono, fosfato de amonio como fuente de fosfato y nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que metabolizan citrato y utilizan fosfato, liberan iones amonio, lo cual, produce una alcalinización del medio (cambia de verde a azul) Citrato $\rightarrow$ CO_2 + Ác. Fórmico + 2 Ác. Acético	<i>Escherichia coli</i> (-), <i>Edwardsiella</i> (-), <i>Enterobacter</i> (+), <i>Klebsiella</i> (+), <i>Salmonella typhi</i> (+)
---------------------------	--	--

MATERIALES Y REACTIVOS

Cepas:

Bacillus subtilis

Escherichia coli

Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus mutans

2 Tubos con caldo glucosa y rojo de fenol

2 Tubos con caldo sacarosa y rojo de fenol

2 Tubos con medio SIM

2 Tubos con leche tornasol

2 Tubos con medio agar Citrato de Simmons

1 Tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* con sello de nujol

1 Tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* sin sello de nujol

2 Tubos con agar urea de Christensen

Mechero

Asa bacteriológica

Portaobjetos

Peróxido de hidrógeno al 3 %

Reactivo de Kovac



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	44/185

EQUIPO

Refrigerador, incubadora

SERVICIOS

Electricidad

Agua corriente

Gas

PROCEDIMIENTO

Utilización de citrato como fuente de carbono

1. Sembrar por estría simple ***Escherichia coli*** en un tubo con medio agar Citrato de Simmons.
2. Sembrar por estría simple ***Salmonella typhi*** en un tubo con medio agar Citrato de Simmons.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar si hubo cambio de color del medio de cultivo.
5. Reportar como positivo si es azul o negativo si permanece verde.

Degradación de leche tornasol

1. Sembrar por agitación ***Bacillus subtilis*** en un tubo con leche tornasol.
2. Sembrar por estría simple ***Streptococcus mutans*** en un tubo con leche tornasol.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias son positivas para fermentación de lactosa, acidificación o alcalinización del medio de cultivo, coagulación, peptonización y formación de gases

Detección de ácido sulfhídrico, indol y movilidad:

1. Sembrar por picadura ***Salmonella typhi*** en un tubo con medio SIM.
2. Sembrar por estría simple ***Escherichia coli*** en un tubo con medio SIM.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Adicionar 2 gotas de reactivo de Kovac y observar la aparición de un anillo color rojo en la superficie lo que es indicativo de producción de indol.
5. Observar que bacterias son positivas para crecimiento fuera de la estría (movilidad) y formación de un precipitado negro (sulfuro de hierro).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	45/185

Producción de ureasa

1. Sembrar por estría simple ***Klebsiella pneumoniae*** en un tubo con agar urea de Christensen
2. Sembrar por estría simple ***Staphylococcus aureus*** en un tubo con agar urea de Christensen
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias hidrolizan la urea un cambio de color rosa indica reacción positiva, sino presenta cambio será una reacción negativa.

Metabolismo de carbohidratos

1. Sembrar por agitación ***Escherichia coli*** en un tubo con caldo sacarosa y rojo de fenol y un tubo con caldo glucosa y rojo de fenol.
2. Sembrar por agitación ***Streptococcus mutans*** en un tubo con caldo sacarosa y rojo de fenol y un tubo con caldo glucosa y rojo de fenol.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias metabolizan sacarosa y cuales glucosa como fuente de energía, si el indicador de pH (rojo de fenol) vira a color amarillo es indicativo de que el carbohidrato se metabolizó en ácidos orgánicos, de lo contrario no cambia de color (permanece rojo).

Oxidación o fermentación de la glucosa

1. Sembrar por picadura ***Staphylococcus epidermidis*** un tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* sin sello de nujol
2. Sembrar por picadura ***Staphylococcus aureus*** un tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* con sello de nujol
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias metabolizan el manitol en presencia de oxígeno (oxidación) y cuáles en ausencia de éste (fermentación).

Actividad de la catalasa

1. En un porta objetos se divide a la mitad y se colocan dos gotas de peróxido de hidrógeno de cada lado.
2. Tomar una muestra ***Staphylococcus aureus* con el asa y extender** en uno de los lados del portaobjetos sobre la gota. (Al tomar la bacteria no olvidar esterilizar el asa antes y después).
3. Tomar una muestra ***Streptococcus mutans*** con el asa extender del otro lado del portaobjetos sobre la gota de peróxido de hidrógeno.
4. Observar que bacterias son positivas para la presencia de la catalasa. La cual se manifiesta por efervescencia (formación de burbujas de oxígeno).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	46/185

RESULTADOS

En el siguiente formato para el reporte de resultados, marcar (+) si la prueba es positiva o (-) si es negativa. Además coloca imágenes a color de cada una de las reacciones obtenidas.

Citrato de Simmons		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Citrato		

Leche tornasol		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Acidificación		
Alcalinización		
Reducción del tornasol		
Coagulación		
Peptonización		

Medio SIM		
	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ácido sulfhídrico		
Indol		
Movilidad		

Medio manitol Hugh-Leifson		
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
Oxidación		
Fermentación		



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	47/185

Metabolismo de carbohidratos		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Sacarosa		
Glucosa		

Producción de ureasa		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ureasa		
Actividad de la catalasa		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Catalasa		

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia del metabolismo microbiano en las enfermedades bucales?
2. ¿Qué tipo de enzima es la catalasa y cómo se demuestra su presencia?
3. ¿Cuál prueba principal se realizó en laboratorio para distinguir 2 géneros de bacterias importantes de cavidad bucal?

BIBLIOGRAFÍA

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. Diagnóstico microbiológico Bailey & Scott. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.

MacFaddin, J. F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. México: Médica Panamericana; 2003.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. Microbiología. 5ª ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2014.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	48/185

PRÁCTICA 5

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LISOZIMA COMO MECANISMO DE DEFENSA INESPECÍFICO

OBJETIVO

Identificar la actividad antimicrobiana de la lisozima en las diferentes secreciones corporales, como mecanismo de defensa inespecífico del organismo y de cavidad bucal.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Composición de la pared celular

Mecanismo de acción de la lisozima

Componentes de la saliva, sudor, lágrima y secreción nasal

FUNDAMENTO TEÓRICO

Al ser la cavidad bucal una de las principales vías de entrada microbiana al organismo, es de suma importancia para el cirujano dentista conocer los mecanismos de defensa inespecíficos presentes en el sistema estomatognático, así como sus funciones, incluyendo la lisozima.

Los mecanismos de defensa de nuestro organismo se clasifican en:

- Específicos
- Inespecíficos

La cavidad bucal tiene ambos mecanismos de defensa, los cuales como su nombre lo indica son los encargados de cuidar y preservar la salud y bienestar de nuestro organismo.

Los mecanismos de defensa locales o inespecíficos reciben su nombre porque actúan contra cualquier agente extraño sin distinguir su tipo y estos se dividen en:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	49/185

A. Barreras físicas o mecánicas.

- Mucosas: Las cuales están constituidas en cavidad bucal por los tejidos que forman una superficie continua de epitelio plano estratificado que protege a los tejidos profundos funcionando como una barrera mecánica la cual se ve apoyada para su función defensiva por la descamación y la queratinización.
- Flujo salival y movimientos de la boca: los cuales impiden la proliferación y adherencia de microorganismos y detritus.
- Esmalte dental: El cual también es una barrera anatómica de gran importancia para defender órganos dentarios.
- Anatomía y posición dentaria.

B. Barreras bioquímicas:

- Tiocianato
- Lisozima
- Peroxidasa
- Lactoferrina
- Mucopolisacáridos
- Complemento
- Capacidad amortiguadora salival
- Fluido gingival

C. Barreras biológicas:

- Leucocitos que participan en fagocitosis
- Trasudación de fluido gingival.
- Microbiota bucal (Relaciones ecológicas microbianas)



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



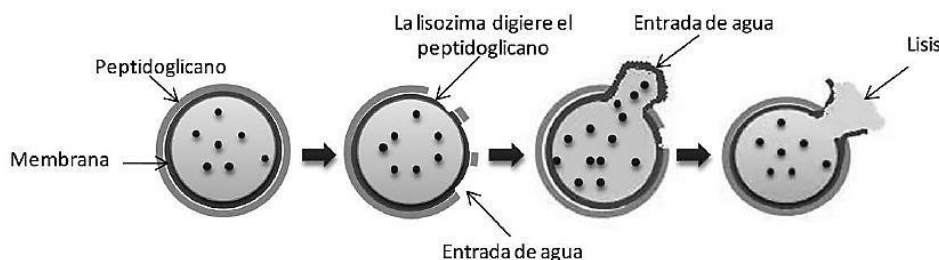
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	50/185

En 1922, Fleming reportó la presencia de una sustancia en la secreción nasal que causaba destrucción de *Micrococcus lysodeikticus*, esta sustancia fue nombrada lisozima. La cual está ampliamente distribuida en los tejidos y fluidos corporales incluyendo la saliva, tejido y fluido gingival, surco gingival, y a nivel general se encuentra en orina, lágrimas, sudor, calostro, líquido prostático, secreción vaginal, nasal, intestinal y bronquial, etc.

La lisozima es una enzima que actúa sobre el peptidoglicano de la pared celular de ciertas bacterias principalmente Gram positivas. Las fuentes de lisozima en saliva, surco gingival, etc. son las glándulas parótida, mandibular, sublinguales y los leucocitos salivales en degeneración.

Mecanismo de acción:

Formación de protoplastos: en una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana citoplasmática.



Fuente: ACTUALIZACIÓN EN Nutrición Vol 14- No 4- diciembre 2013.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 caja de agar Soya Trypticaseína
- 1 tubo con *Micrococcus lysodeikticus*
- 1 asa bacteriológica
- 1 tubo con 5 discos de papel filtro estériles
- 1 pinza de curación
- 1 mechero
- 1 gradilla
- 1 tubo con solución salina estéril



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	51/185

EQUIPO

Refrigerador

Incubadora

SERVICIOS

Luz, agua, gas

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar con *Micrococcus lysodeikticus* en forma masiva con el asa bacteriológica la caja con Agar Soya Trypticaseína.
 2. Colocar distribuidos en la caja de Petri previamente etiquetada un disco humedecido con:
 - a) saliva
 - b) sudor
 - c) lágrimas
 - d) secreción nasal en caso de no tener, puede sustituirse por orina
 - e) solución salina estéril
- Las muestras deben ser de un mismo donador para cada caja (1 por equipo)
3. Incubar a 37° C por 24 horas.
 4. Leer y medir halos de inhibición de crecimiento por acción de la lisozima. Identificar a que secreción pertenece cada halo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	52/185

RESULTADOS.

1. Realizar una tabla con los siguientes datos:

Secreción	Halo de inhibición en mm.
Saliva	
Sudor	
Lágrima	
Secreción nasal u orina	
Solución salina	

2. Analizar sus resultados en cuanto a la actividad de la lisozima presente en cada secreción y su eficacia.

CUESTIONARIO

1. ¿A qué se le llama mecanismos de defensa inespecíficos?
2. Explique dos mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad bucal diferentes a la lisozima.
3. Escriba cuál es la importancia de los mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad bucal.
4. Escriba otros usos de la lisozima diferentes al mecanismo de defensa.
5. ¿Explicar la causa por la que se produce la enfermedad parodontal con relación a los mecanismos de defensa inespecíficos?



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	53/185

BIBLIOGRAFÍA

1. Nolte, W.A. Microbiología odontológica. 4º ed. México. Edit. Nueva Editorial Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.
2. Liébana Ureña J. Microbiología Oral. 2º ed. España. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana de España. 2002
3. Jawetz, E. Microbiología Médica. 16ª ed. México. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 1999
4. Wilman Carrillo. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. Actualización En Nutrición Vol 14 - Nº 4 - diciembre 2013.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	54/185

PRÁCTICA 6 FAGOCITOSIS

OBJETIVO

Identificar la importancia de la fagocitosis a través de la observación de campos fijos como mecanismo de defensa inespecífico del organismo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Definición de fagocitosis

Mecanismos de defensa inespecíficos y específicos

Células del Sistema Inmune

FUNDAMENTO TEÓRICO

La fagocitosis es un mecanismo de defensa inespecífico encargado de eliminar agentes extraños, se caracteriza por la ingesta de partículas grandes y la llevan a cabo los fagocitos, células que fueron descubiertas por Elie Metchikoff en 1892. Los neutrófilos y los macrófagos, son fagocitos y se encuentran ampliamente distribuidos en todos los tejidos del cuerpo. En el caso de los macrófagos circulan en el torrente sanguíneo en un estado inmaduro, llamado monocito. Cuando estas células llegan a los tejidos maduran y se convierten en macrófagos, los cuales los podemos encontrar en todos los tejidos y órganos del cuerpo (hueso, pulmones, hígado, sistema nervioso, piel, mucosa oral, etc.), dependiendo del sitio donde se encuentren los macrófagos reciben un nombre especial, por ejemplo, en el pulmón se llaman macrófagos alveolares.

La presencia de un agente extraño (bacterias, hongo, etc.), induce la secreción de quimiocinas, cuya función es atraer a los leucocitos del torrente sanguíneo hacia las zonas de infección (quimiotaxis). Los fagocitos son las primeras células en llegar a estas zonas, en donde por diferentes mecanismos son capaces de reconocer a los agentes extraños y eliminarlos al llevar a cabo la fagocitosis. El proceso de fagocitosis involucra varias etapas que a continuación describiremos:

- 1) Reconocimiento:** Es indispensable que los fagocitos reconozcan y se adhieran a los microorganismos. Para ello, los macrófagos poseen en su superficie receptores que les permiten reconocer directamente moléculas presentes en la membrana o pared celular de las bacterias. Por otro lado, también pueden reconocer a los anticuerpos unidos a las bacterias (opsonizadas), en este caso se lleva a cabo una fagocitosis mediada por anticuerpos. Aunque la opsonización facilita el proceso de fagocitosis, no es indispensable para que los fagocitos puedan ingerir las partículas (Fig. 6.1).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	55/185

- Ingestión:** La unión del macrófago al agente extraño, induce señales que provocan cambios en la membrana celular del fagocito y que le permite englobar al microorganismo e ingerirlo. En este proceso el agente extraño queda contenido en una vesícula llamada fagosoma (Fig. 6.1).
- Digestión:** Durante esta etapa, se lleva a cabo la muerte y degradación del microorganismo, para ello, el fagosoma se fusiona con un lisosoma presente en el citoplasma del fagocito, el resultado es la formación de un fagolisosoma, el cual contiene al microorganismo y un conjunto de enzimas encargadas de matarlo y degradarlo (Fig. 6.1).
- Excreción:** Después de la digestión del microorganismo, es necesario eliminar los desechos, esto se lleva a cabo mediante la exocitosis.

ETAPAS DE LA FAGOCITOSIS

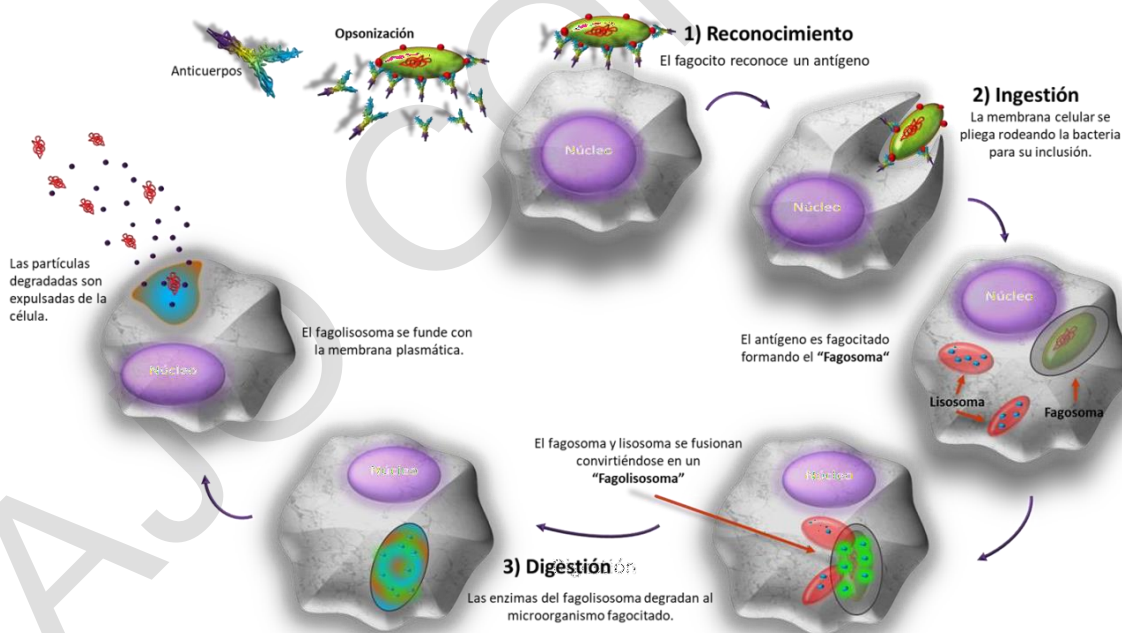


Figura 6.1: Etapas de la Fagocitosis (elaborado por Juan Carlos Paredes Molsalvo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	56/185

En cavidad bucal la fagocitosis se lleva a cabo principalmente en el surco gingival ya que el fluido gingival contiene neutrófilos y monocitos. Es importante mencionar que el proceso de fagocitosis, no solo se encarga de ingerir y destruir partículas extrañas, también participa en la eliminación de células muertas de nuestro cuerpo por causas naturales o por daño.

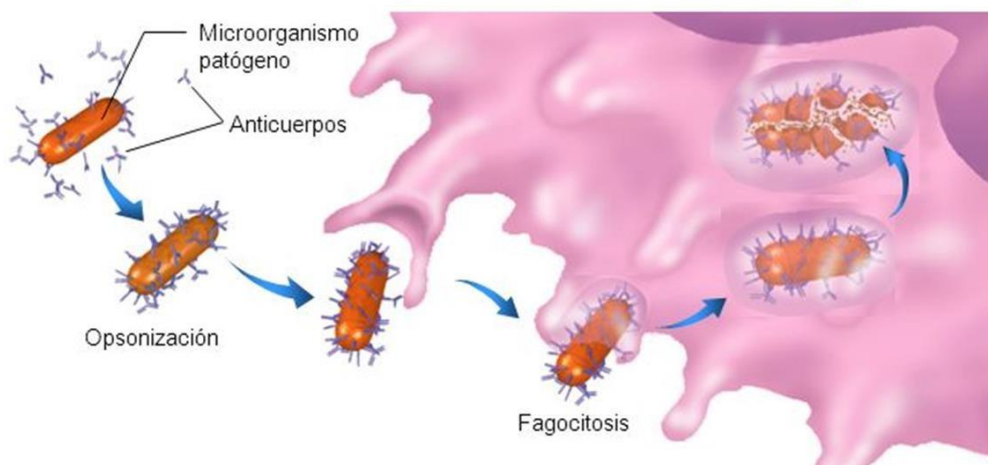


Figura 6.2: Fagocitosis mediada por anticuerpos. Etapas representativas de la fagocitosis de una bacteria cubierta de anticuerpos (Opsonizada). Se muestra el reconocimiento, la ingestión y digestión. (Fuente: <https://www.youtube.com/watch?v=IN5Lr4qUQQU>)

En la siguiente dirección, puedes visualizar en video la fagocitosis realizada por fagocitos vivos: <https://www.youtube.com/watch?v=IN5Lr4qUQQU>

MATERIALY REACTIVOS

- Preparaciones fijas de fagocitosis
- Aceite de inmersión

EQUIPO

Microscopio

SERVICIOS

Luz, agua



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	57/185

PROCEDIMIENTO

- Observar cuidadosamente a 100x (inmersión) las preparaciones fijas identificando los pasos de la fagocitosis.
- Realizar dibujos de las observaciones.

RESULTADOS

- Realizar los dibujos de las observaciones mencionando qué pasos de la fagocitosis observó e identifique qué células están participando en la fagocitosis.

CUESTIONARIO

1. Mencione que enzimas y sustancias intervienen en la destrucción de partículas extrañas durante la fagocitosis.
2. Defina pinocitosis
3. Mencione que células participan en el proceso de fagocitosis

BIBLIOGRAFÍA

1. Abul. K. Abbas, Andrew H. Lichman, Shiv Pillai. Inmunología celular y molecular. 8º edición España. Editorial Elsevier. 2015
2. Abbas K. Abul. Inmunología básica. 5ta edición España. Editorial Elsevier. 2017
3. Jawetz, E. Microbiología Medica. 16ª ed. México. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 1999
4. Liébana Ureña J. Microbiología Oral. 2º ed. España. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana de España. 2002.
5. Nolte, W.A. Microbiología odontológica. 4º ed. México. Edit. Nueva Editorial Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	58/185

PRÁCTICA 7

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

OBJETIVO

Identificar a la aglutinación como una técnica que permite evidenciar *in vitro* la interacción antígeno-anticuerpo mediante la determinación de grupos sanguíneos.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Concepto de aglutinación

Reacción antígeno-anticuerpo

Diferentes grupos sanguíneos

FUNDAMENTO TEÓRICO

La reacción antígeno-anticuerpo forma parte de los mecanismos de defensa del cuerpo humano. El conocimiento detallado de este proceso ha permitido su uso en diferentes aplicaciones clínicas, ya que nos ayuda a identificar la presencia o ausencia de hormonas, antígenos, anticuerpos, enzimas, células, etc., en diversos fluidos corporales (sangre, orina, saliva, etc.). Los análisis de laboratorio basados en la interacción antígeno-anticuerpo son importantes para el diagnóstico de enfermedades, evaluación de tratamientos o para dar seguimiento a procesos fisiológicos normales; ejemplo de lo anterior, son las pruebas para detectar la infección con el VIH o las pruebas de embarazo.

La reacción de aglutinación, es la interacción *in vitro* de un anticuerpo (aglutinina) con un antígeno (aglutinógeno), este último localizado en la superficie de una célula o partícula, generalmente este proceso es visible sin ayuda de un microscopio (Figura 7.1). Las reacciones de aglutinación se clasifican en dos tipos:

- Aglutinación directa:** esta reacción se lleva a cabo cuando de manera natural una célula o partícula insoluble presenta en su superficie uno o más antígenos que reaccionan con anticuerpos específicos. Por lo tanto, células, bacterias y hongos pueden ser aglutinados fácilmente por los anticuerpos, debido a que en su superficie presentan numerosos antígenos. Ejemplo de lo anterior, son las pruebas para determinar el grupo sanguíneo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	59/185

- b) **Aglutinación indirecta:** esta reacción sucede cuando la superficie de células o partículas inertes se recubren artificialmente con el antígeno de interés. Generalmente se emplean eritrocitos o partículas de látex, las cuales actúan como soporte pasivo del antígeno.

Como ya se mencionó la determinación de grupos sanguíneos es un ejemplo de la reacción de aglutinación directa, la prueba identifica la presencia o ausencia de antígenos característicos de los eritrocitos (glóbulos rojos de la sangre). De acuerdo a la distribución de los isoantígenos A y B en los eritrocitos, la sangre de toda persona queda incluida entre los cuatro grupos denominados A, B, AB y O, según tengan un antígeno (A o B), o los dos (AB) o carezcan de ellos (O). Aunado a lo anterior, en 1940 Landsteiner y Wiener determinaron la existencia de otro antígeno, el factor Rh, denominado así debido a que también se encuentra en la sangre del mono Rhesus. Las personas que presentan el factor Rh son Rh positivos (+) y los que no lo poseen son Rh negativos (-). Lo anterior resalta la importancia de la reacción de aglutinación *in vitro*, gracias a ella podemos determinar el tipo de sangre de todas las personas. Lo anterior es fundamental al momento de realizar una transfusión sanguínea, para evitar una reacción de hemólisis, que puede culminar con la muerte del paciente.

La reacción *in vitro* se lleva a cabo por la reacción inmunológica entre los eritrocitos presentes en una gota de sangre y los anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno A (suero anti-A), antígeno B (suero anti-B) o antígeno D (suero anti-D o anti-Rh). La presencia o ausencia de aglutinación, determinará el tipo de sangre.

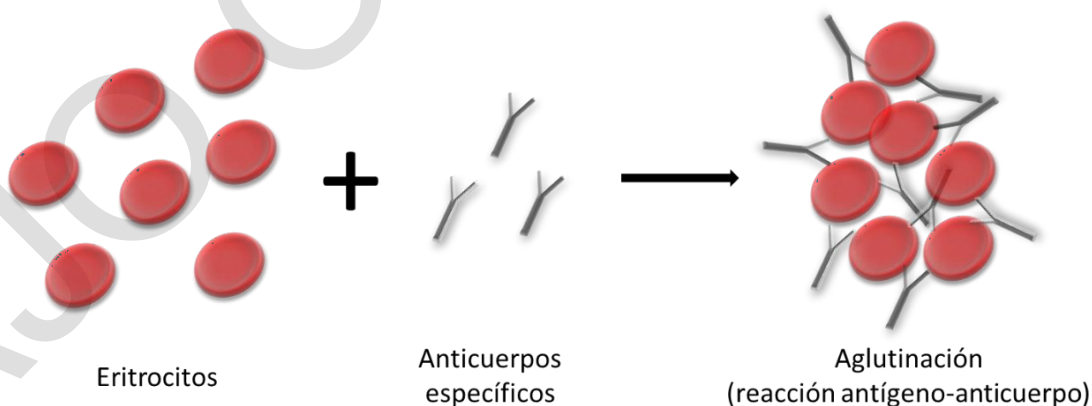


Figura 7.1 Reacción de aglutinación. Los anticuerpos específicos reaccionan con los antígenos presentes en la superficie de los eritrocitos, lo anterior provoca que los glóbulos rojos se agrupen y formen grumos fácilmente visibles. (Fuente: Dra. Marta Elena Castro Manreza)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	60/185

MATERIALY REACTIVOS

- Torunda con alcohol
- Lancetas estériles
- Portaobjetos
- Aplicadores de madera
- 1 frasco de suero hemotipificador “A”
- 1 frasco de suero hemotipificador “B”
- 1 frasco de suero hemotipificador Rh o “D”
- 1 bote con cloro
- Bote rojo de RPBI

EQUIPO

Refrigerador

SERVICIOS

Luz y agua

PROCEDIMIENTO

1. Desinfectar la yema de un dedo con una torunda empapada en alcohol
2. Obtener sangre del dedo, a través de una punción con una lanceta estéril.
3. Colocar en un portaobjetos limpio tres gotas de sangre separadas.
4. En la primera gota de sangre colocar una gota de suero anti-A, en la segunda gota de sangre, una gota de suero anti-B y en la tercera una gota de suero anti-D.
5. Mezclar perfectamente con ayuda de un palillo cada gota de sangre con su reactivo, por separado.
6. Esperar resultados y observar la reacción de aglutinación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	61/185

RESULTADOS

Dibuja o fotografía tus resultados, con base en las siguientes observaciones:

1. La presencia de grumos en la mezcla en un lapso de minutos, indica la unión antígeno-anticuerpo (prueba positiva)
2. La ausencia de grumos indica que no existe reacción de aglutinación (prueba negativa).
3. Se observará en qué mezcla hubo aglutinación, reportando como grupo sanguíneo "A" si hubo aglutinación en el suero anti-A, o como grupo sanguíneo "B" si hubo aglutinación con el suero anti-B, si aglutina en ambos grupos sanguíneos se reporta como grupo sanguíneo "AB", y si no aglutina grupo sanguíneo "O".
- Si aglutina con el suero anti-D, Rh positivo, si no aglutina Rh negativo.

CUESTIONARIO

1. Defina precipitación
2. Indique la diferencia entre precipitación y aglutinación
3. Mencione por lo menos otra prueba diagnóstica que implique una reacción de aglutinación y cuál es su importancia.
4. Dé tres ejemplos de técnicas inmunológicas de aglutinación en saliva, orina o suero, explique su uso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks, Butel, Morse. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelbert. 16º ed. Editorial el Manual Moderno. México 1999.
2. Negroni Marta. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina, 1999.
3. Tristram G.I. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I Terr, John B. Imboden. Inmunología Básica y Clínica. 10º ed. Editorial El Manual Moderno. México 2001.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	62/185

PRÁCTICA 8

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DENTAL “IN VITRO”

OBJETIVO

Conocer la capacidad de algunos microorganismos de cavidad oral, para adherirse a superficies duras en presencia y ausencia de carbohidratos.

CONCEPTOS PREVIOS

Definición de biopelícula dental

Microorganismos de importancia en la formación de biopelícula dental.

Microorganismos involucrados en la formación de biopelícula (supra y subgingival)

Enfermedad bucodental asociadas a la biopelícula.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La caries dental y la enfermedad periodontal comparten un origen común conocido como biopelícula, por lo cual el conocimiento y la comprensión de los mecanismos involucrados en su formación son importantes para el cirujano dentista, ya que le permiten implementar medidas preventivas y de control.

La cavidad bucal proporciona diferentes sitios para la colocación y crecimiento microbiano entre los que se encuentran saliva, labios, mejillas, paladar, lengua, encía y dientes.

Las características anatómicas y la composición bioquímica de los dientes pueden favorecer la instalación y proliferación de microorganismos (principalmente bacterias) para dar origen la biopelícula.

La colonización microbiana específica comprende diferentes momentos que incluyen la adherencia, agregación, coagregación, crecimiento y reproducción de los microorganismos que se adhieren a la película adquirida. (Figura 8.1)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	63/185

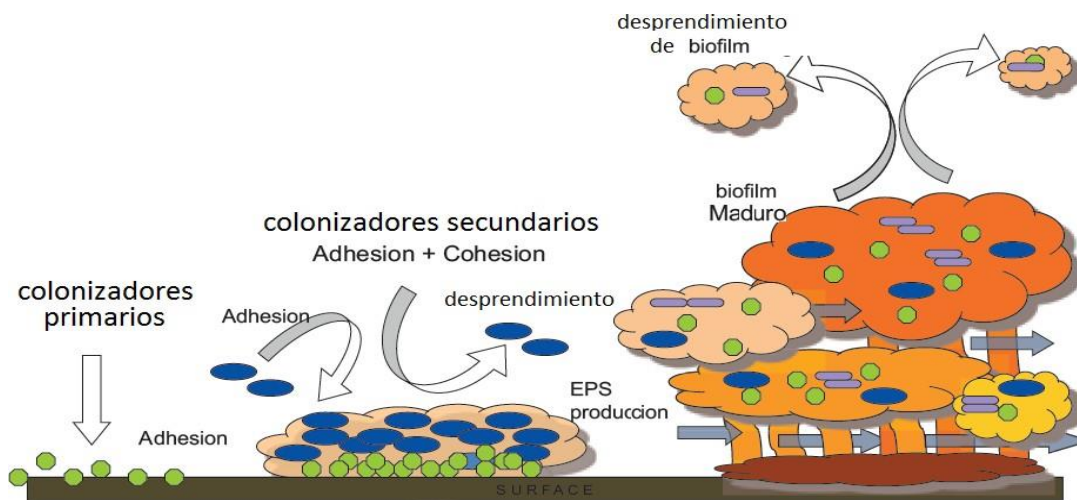


Figura 8.1. Secuencia de desarrollo de placa microbiana. Tomado de Seneviratne et al., 2011

La biopelícula se inicia con la formación de película adquirida donde participan las glucoproteínas principalmente derivadas de la saliva y entre las que se encuentran la amilasa, histatinas, estaterinas, lisozima, anticuerpos (principalmente Ig A), entre otras, que se depositan sobre la superficie de los dientes a partir de las cargas eléctricas de ambas partes.

La película formada adquiere funciones protectoras al proporcionar lubricación a las superficies e impidiendo la pérdida de humedad del tejido.

Sobre la superficie del esmalte, comienza a depositarse una película delgada amorfa. Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electrostáticas, tipo Van der Waals e hidrófobas. Es por ello, que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfato con carga negativa, interactúa con proteínas y glucoproteínas salivales y del fluido crevicular con carga positiva. (Figura 8.2.A)

Una vez que se forma la película adquirida, es colonizada por microorganismos que residen en la cavidad bucal. Las bacterias se adhieren a las glucoproteínas de la película en forma casi inmediata. Algunos mecanismos por los cuales las bacterias se unen a las superficies dentales es mediante receptores específicos de la película mediante moléculas bacterianas específicas llamadas adhesinas lo que facilita su adherencia y proliferación. (Figura 8.2.B)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	64/185

Las principales adhesinas son:

- capa mucosa,
- cápsula
- glucosiltransferasas (GTF),
- proteínas que fijan glucanos,
- proteínas o glucoproteínas que se fijan a la película que recubre materiales como prótesis o los dientes,
- ácidos teicoicos, en forma especial los lipoteicoicos de las paredes celulares bacterianas
- polisacáridos del antígeno O
- fimbrias.

Los receptores son compuestos del hospedero que interactúan con las adhesinas, y pueden ser:

- a) elementos celulares (glicocalix, proteínas y glucoproteínas de la membrana citoplasmática)
- b) sustancias existentes en el origen del medio celular (fibronectina o mucina) y
- c) superficies lisas a través de la película adquirida que las recubre.

Algunos autores mencionan que otro factor que permite la unión de los microorganismos o las superficies dentales es la formación de puentes de calcio con carga positiva, que permiten la unión de componentes bacterianos con carga negativa a la superficie dental que también posee carga negativa. (Figura 8.2.C)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	65/185

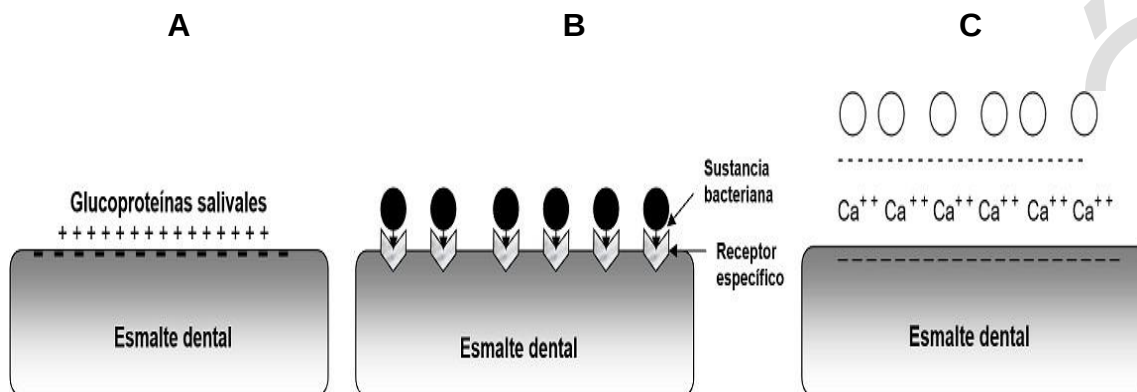


Figura 8.2 Formación de la biopelícula: 1.A) Muestra la afinidad de las cargas de las glucoproteínas salivales y su afinidad por el esmalte dental. 1.B) Muestra las sustancias bacterianas y los receptores específicos para ellas. 1. C) Muestra la unión de las bacterias a la película adquirida mediante puentes de calcio. Tomado de:

MATERIAL

1 Tubo de ensaye 18x150mm con tapón de hule con 15 ml de medio base rojo de fenol más sacarosa al 5 %

1 Tubo de ensaye 18x150mm con tapón de hule con 15 ml de medio base rojo de fenol.

1 Tubo de ensaye 18x150mm estéril

1 Paquete con 2 hisopos estériles.

Pipeta de 1 ml

Mechero

EQUIPO

Refrigerador

Incubadora.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	66/185

SERVICIOS

Electricidad

Agua corriente

Gas

PROCEDIMIENTO O TÉCNICA

Sembrado de biopelícula:

1. Colectar en un tubo de ensaye 18x150mm estéril, 2 ml de saliva de un integrante del equipo que no se haya efectuado limpieza dental.
2. Con un hisopo estéril, raspar la superficie de una de las arcadas dentarias con acumulación de biopelícula dental.
3. Sembrar por agitación la muestra del hisopo en un tubo sin sacarosa.
4. Adicionar 0.5 ml de saliva al tubo.
5. Tapar el tubo con un tapón de hule.
6. Incubar a 37° C durante 24 horas.
7. Realizar el mismo procedimiento en el tubo con sacarosa a partir del paso 2
8. Monitorear durante 7 días la formación de biopelícula dental de ambos tubos.

NOTA: Los tubos nunca deberán ser agitados, de lo contrario no se observará formación de biopelícula.

Este material será utilizado para la práctica siguiente de aislamiento de microorganismos de la biopelícula dental (practica 9).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	67/185

RESULTADOS

Observar la formación de biopelícula en la pared de los tubos, así como el cambio del color del medio.

Formato para el reporte de resultados.

Tubo 1 Sin sacarosa			Tubo 2 Con sacarosa		
Crecimiento	☐ si	☐ no	Crecimiento	☐ si	☐ no
Acidificación	☐ si	☐ no	Acidificación	☐ si	☐ no
Burbujas	☐ si	☐ no	Burbujas	☐ si	☐ no

CUESTIONARIO

1. Mencione ¿cuáles son los microorganismos cariogénicos y cuales los relacionados con la enfermedad periodontal?
2. Mencione ¿a qué se debe el cambio de color del medio en los tubos sembrados y la producción de burbujas?
3. Explique ¿qué es y a que se debe la formación de una película blanca alrededor del alambre en su experimento? Si no se forma explique sus causas.
4. ¿Qué es el cálculo dental?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	68/185

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks, G. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica 25a. México McGraw Hill. 2011, 11-13
2. Burrows, W. Tratado de microbiología (No. 576 B877 1979.). Interamericana. 1974
3. Carrol, K.C., Morse, S.A., Mietzner, T.A., Miller, S. Microbiología médica. 27ª ed. México Ed. Mc Graw Hill. 2016
4. Liébana, J. Microbiología oral. Granada: Mc Graw Hill Interamericana. 2002. 22-24
5. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5ª ed. Gran Bretaña: Amolca. 2011
6. Mouton Christian, Robert Jean-Claude, Bacteriología Bucodental. Barcelona. Editorial Masson S.A. P.p19-46
7. Negroni, M. Microbiología estomatológica. 3ª. Edición. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2018, 481-488
8. Seneviratne, C. J., Zhang, C. F., & Samaranayake, L. P. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. Chin J Dent Res, 14(2), 87-94.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	69/185

PRÁCTICA 9

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE BIOPELÍCULA DENTAL

OBJETIVO

Identificar los microorganismos presentes en la biopelícula a través de medios de cultivo, diferenciando su morfología colonial y microscópica en cada uno de ellos.

CONCEPTOS PREVIOS

- Función de los polímeros extracelulares.
- Fases de la formación de la biopelícula dental.
- Microorganismos asociados a caries dental y enfermedad periodontal.
- Mecanismos anaerobios en la formación de biopelícula dental

FUNDAMENTO TEÓRICO

La biopelícula dental se define como una comunidad microbiana que se encuentra sobre la superficie dental, formando una placa embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival. Fue descrita por primera vez en 1898 por Black, como una masa microbiana que recubría las lesiones cariosas.

El término biofilm o biopelícula fue definido por Costerton en 1978, como una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se encuentran unidas a una superficie, embebidas en una matriz extracelular que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota.

La biopelícula es un medio donde se realiza intensa actividad metabólica por parte de los microorganismos que en ella se encuentran dando por resultado alteraciones en los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal donde se localiza, por lo que se considera el principal agente etiológico en el desarrollo de la gingivitis, caries dental y enfermedades periodontales.

La biopelícula se clasifica según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente, y por su potencial patogénico en cariogénica y periodontopatogénica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	70/185

La biopelícula supragingival está constituida principalmente por microorganismos Gram positivos capaces de fermentar azúcares produciendo ácidos que desmineralizan los tejidos duros del diente; esta placa se puede extender hacia el surco gingival y entrar en contacto con la encía denominándose placa marginal.

La biopelícula que se encuentra en el interior del surco gingival es la que recibe el nombre de biopelícula subgingival y está constituida principalmente, por microorganismos de tipo anaerobio proteolíticos Gram negativos periodontopatogénicos.

Según Marsh, *Streptococcus sanguis* es el primer microorganismo en colonizar la película adquirida y posteriormente se une a *Actinomyces viscosus* lo cual es prerequisite para la posterior colonización de especies como *Veillonella* y *Fusobacterium*. Otras bacterias involucradas en el proceso de colonización son estreptococos del grupo viridans (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*), *Actinomyces sp.* *Neisserias sp.*

Se han descrito coagregaciones entre *S. sanguis* con *A. viscosus* y entre *Capnocytophaga ochracea* con *A. viscosus*. También entre especies Gram positivas con Gram negativas como *Streptococcus sp.* o *Actinomyces sp.* con *Prevotella sp.* y *Porphyromonas sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella sp.*, y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *F. Nucleatum*. En las últimas fases de formación de la placa, es probable que predomine la coagregación entre especies Gram negativas anaerobias como *F. nucleatum* con *Prevotella gingivalis*, este fenómeno provee las condiciones para la interacción patogénica característica de las infecciones periodontales.

La matriz intercelular de la placa dental madura, está formada por productos microbianos, células (epiteliales y leucocitos), materiales orgánicos (polisacáridos, proteínas y glucoproteínas) e inorgánicos (calcio y fósforo) derivados de la saliva y el fluido gingival (crevicular). Esta matriz intercelular es el medio donde se producen las interacciones metabólicas entre las diferentes especies microbianas.

Durante la fase de colonización primaria de los microorganismos existe multiplicación activa, posteriormente, existe una disminución en la velocidad de crecimiento de algunos de ellos y se incorporan otros que son transportados por los mismos mecanismos que utilizaron los primeros colonizadores de la película adquirida.

La etapa de colonización secundaria y terciaria se caracteriza por el aumento del grosor de la biopelícula, las zonas más profundas se hacen más anaerobias por lo que las bacterias aerobias prácticamente desaparecen, se observa multiplicación de algunas bacterias ya existentes y los fenómenos de agregación y coagregación, de esta manera la estructura de la biopelícula cambia significativamente con el incremento de formas bacilares.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	71/185

La síntesis de polisacáridos extracelulares especialmente mutanos, por estreptococos del grupo mutans, contribuyen de manera importante a la integridad de la placa, estos polisacáridos extracelulares junto con dextranas y levanas, formando microcolonias. Es importante mencionar que después de pasado cierto tiempo los estreptococos a partir de la glucosiltransferasas habrán tenido la oportunidad de producir mayor cantidad de polisacáridos adherentes por lo que los lactobacilos disponen ya de mallas más complejas para quedar retenidos.

En la fase de maduración de la biopelícula se detecta *Treponema denticola* en las zonas más profundas donde el potencial de oxidoreducción es muy bajo. Al envejecer la biopelícula, las capas más internas, tendrán menos aporte de oxígeno y nutrientes. Los productos de desecho se acumulan y hay una reducción gradual de microorganismos vivos, por lo cual, en algunos estudios microscópicos se observa la existencia de espacios vacíos por autólisis de algunas bacterias.

MATERIAL y REACTIVOS

- 1 Tubo de ensaye 18 x 150mm con 15 ml. de medio base rojo de fenol más sacarosa al 5% más placa microbiana y saliva.
- 1 Caja de Petri con agar sangre
- 1 Caja de Petri con agar Staphylococcus- 110
- 1 Caja de Petri con agar Rogosa
- 1 Caja de Petri con Agar Streptococcus- mitis- salivarius (SMS)
- 1 Mechero
- Porta objetos
- Asa bacteriológica
- Paquete con 2 hisopos
- 1Equipo de Gram

EQUIPO

- Microscopio
- Incubadora
- Refrigerador



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	72/185

SERVICIOS

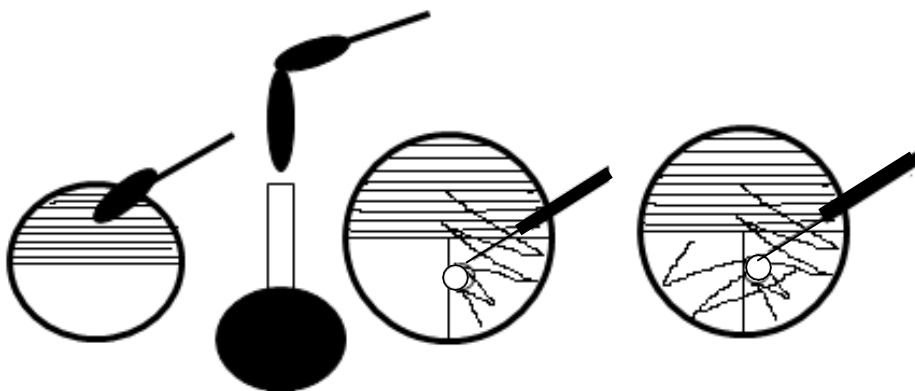
Luz, agua, gas

PROCEDIMIENTO

1. Sin agitar, tomar muestra con un hisopo estéril (donde hubo formación de biopelícula dental) del tubo con medio de sacarosa 5% + biopelícula + saliva y sembrar por estría cruzada, para el aislamiento de microorganismos en los siguientes medios de cultivo:

- Agar sangre (medio enriquecido)
- Agar Staphylococcus-110 (medio selectivo para Staphylococcus)
- Agar Rogosa (medio selectivo para Lactobacillus).
- Agar Streptococcus-mitis salivarius (SMS). (medio selectivo para Streptococcus)

ESQUEMA:



- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Realizar un frotis de la placa microbiana formada, tomando la muestra con un hisopo estéril, en un porta objeto limpio y desengrasado, fijar al calor y teñir mediante la técnica Gram.
- Observar al microscopio con los objetivos 40x y 100x.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	73/185

RESULTADOS

1. Reportar si hay crecimiento en los 4 medios de cultivo.
2. Si hubo crecimiento, registrar en una tabla la descripción de la morfología colonial en cada uno de los medios, además del tipo de hemólisis en el medio de agar sangre. (ver anexo 1)
3. Ilustrar la observación del frotis de biopelícula en el objetivo 100x. Describir la morfología microscópica observada.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué papel juegan los microorganismos anaerobios en la biopelícula dental?
2. ¿Qué papel se atribuye a Veillonella, dentro del biopelícula dental?
3. ¿Por qué se considera necesario evitar el desarrollo de la biopelícula dental?
4. Si en alguno de los medios de cultivo, no hubo crecimiento, explique por qué.
5. Mencione las medidas preventivas para el control de la biopelícula dental supra y subgingival.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid España. Editorial Mc Graw Hill. 2002: 541-559
2. Negroni, M. Microbiología estomatológica. 3ª. Edición. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2018, 481-488
3. Mouton Christian, Robert Jean-Claude, Bacteriología Bucodental.
4. Barcelona. Editorial Masson S.A. P.p19-46
5. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5ª ed. Gran Bretaña: Amolca. 2011



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	74/185

PRÁCTICA 10

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS PRESENTES EN SALIVA

OBJETIVO

Determinar la presencia así como el número aproximado de bacterias viables presentes en la saliva humana.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Definición de microbiota

Cantidad de bacterias presentes en saliva

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de que existen microorganismos en la cavidad bucal, es de fundamental importancia para el cirujano dentista, al igual que conocer el tipo de microbiota que existe, ya que dependiendo del tipo de flora que se instala, esta puede ser considerada como factor de riesgo para patologías en la cavidad bucal.

La presente práctica facilitará al alumno el aislamiento de microorganismos en saliva y le permitirá a través de la técnica de Gram identificar de manera general, su clasificación y morfología

La saliva como un fluido corporal tiene principalmente dos funciones: digestión y protección.

1. Digestión: Los alimentos sólidos y semisólidos son disueltos en la saliva como un prerequisite para el comienzo de la digestión. La amilasa es una enzima que hidroliza el almidón y es el mayor componente proteico de la saliva.

Las secreciones mucinosas y serosas que conforman la saliva se encargan de lubricar las estructuras orales con lo cual ayudan a la masticación, deglución y fonación.

2. Actividad protectora: Los amortiguadores (Buffers) salivales evitan los cambios extremos del pH ocasionados por alimentos ácidos o productos bacterianos.

También la saliva contiene enzimas antimicrobianas que pueden ocasionar gran impacto al desafío o ataque bacteriano, aunque a la flora microbiana normal de cavidad oral no la perjudique.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD

MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	75/185

Algunos componentes minerales de la saliva juegan papeles importantes en los mecanismos de protección de los dientes ante los ataques de ácidos que provocan la desmineralización y remineralización del esmalte.

Las secreciones mucionosas son muy importantes para la protección de las membranas mucosas evitando la deshidratación.

Aproximadamente 700-800 ml. De saliva son secretados y tragados por día, siendo la saliva un factor importante en la conservación del agua para el organismo.

Al mismo tiempo como la saliva pasa por todas las regiones de la cavidad bucal como son los carrillos, lengua, dientes, surco gingival, entre otros, realiza un barrido parcial de la flora microbiana que se aloja en cada una de estas zonas, por lo que es muy fácil encontrar en un cultivo de saliva a microorganismo como: estreptococos, peptoestreptococos, veillonella, corynebacterium, neiserias, nocardia, fusobacterium, bacteroides, actinomyces, lactobacilos, espiroquetas, levaduras, protozoarios y otros.

Al realizar un cultivo de saliva obtenemos un número aproximado de bacterias presentes en cavidad bucal, pero esto no quiere decir que al realizar el cultivo vamos a tener la certeza del tipo de microorganismos de la flora microbiana bucal.

Al realizar estudios de la flora microbiana bucal, nos vamos a encontrar con varios problemas, pues la flora microbiana presenta cambios progresivos hasta que madura y aun así seguirá cambiando a causa de la edad, cambios hormonales, problemas sistémicos, dieta, incluso la hora de la toma de la muestra de saliva nos va a variar el resultado o conteo microbiano en un mismo individuo, es por esto que da cifras exactas de número de bacterias en saliva no es conveniente, por eso se dan aproximaciones en cuanto a cantidad y tipo de microorganismos existentes en cavidad oral.

Nolte, menciona que en 1 ml de saliva de un adulto podemos encontrar aproximadamente 6,000 millones (6×10^9) de bacterias.

Para el estudio de bacterias de cavidad bucal, se han utilizado principalmente dos técnicas el frotis directo y el cultivo en placa.

El frotis directo nos va a decir que tipo de bacterias estamos viendo al microscopio más no el número de ellas.

El cultivo en placa nos va a determinar el número de colonias o (CFU) unidades productoras de colonias que se encuentran en 1 ml. de saliva, aunque si recordamos lo que se refiere Nolte, es imposible cuantificar seis mil millones una caja de Petri, por lo que se hace necesario la utilización de diluciones decimales antes de la siembra.

Antes de realizar la siembra debemos tomar en cuenta otros factores como son en que medio vamos a sembrar y con qué técnica.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	76/185

Referente al medio de cultivo debemos tener bien claro si queremos cuantificar el total de bacterias o si queremos solo un tipo de ellas; en este caso queremos conocer el total de bacterias por lo tanto, vamos a utilizar un medio de cultivo como el Agar Soya Trypticase, que es un medio rico para el crecimiento de todas las bacterias.

Respecto a la técnica, vamos a utilizar el vaciado en placa, porque solo utilizaremos 1 ml. de saliva y esta técnica favorece la diseminación de las bacterias en todo el Agar. Recordamos que vamos a cuantificar no a aislar.

MATERIAL

1 tubo estéril para colectar la saliva 18x150mm

2 pipetas de 1ml estériles

3 cajas de Petri estériles 100x15mm

1 matraz Erlenmeyer (1000 mL) con Agar Soya Trypticase

6 tubos de 13x100mm con 4.5ml de solución salina estéril

1 equipo de tinción de Gram

Hisopos estériles

Portaobjetos

Mechero

Tripié con rejilla de asbesto

Guante de asbesto

EQUIPO

Microscopio

Refrigerador

Incubadora

SERVICIOS

Luz, agua, gas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	77/185

PROCEDIMIENTO

1. Recolectar un mililitro de saliva aproximadamente, en un tubo de ensaye estéril.

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

1. Preparar seis diluciones decimales de saliva colectada con la primer pipeta, en condiciones de esterilidad de la siguiente manera:

Tubo 1... 0.5ml. de saliva + 4.5ml. de sol. salina=1:10 (10-1)

Tubo 2... 0.5ml. de dilución 1:10+4.5ml. sol. salina=1:100 (10-2)

Tubo 3... 0.5ml. de dilución 1:100+4.5ml. sol. salina=1:1000 (10-3)

Tubo 4... 0.5ml. de dilución 1:1000+4.5ml. sol. salina=1:10000 (10-4)

Tubo 5... 0.5ml. de dilución 1:10000+4.5ml. sol. salina=1:100000 (10-5)

Tubo 6... 0.5ml. de dilución 1:100000+4.5ml. sol salina=1:000000 (10-6)

2. Con la segunda pipeta, pipetear 1.0 ml. de las tres últimas diluciones (tubos 6, 5 y 4) en tres cajas de petri estériles previamente etiquetadas con los tubos correspondientes (caja 4 para tubo 4 etc.). Comenzar con la dilución del tubo 6.
3. Adicione a cada caja 15 o 20 ml. de agar soya tripticasa previamente fundido y a temperatura de aproximadamente 37°C., homogenizar el medio con la saliva y dejar solidificar.
4. Incubar a 37°C por 24 h.
5. Contar el número de colonias en las placas, en caso de ser demasiado el crecimiento en las cajas, dividir en cuatro y contar las de un cuadrante multiplicar el resultado por cuatro y así tenemos el resultado de toda la caja, después multiplicar este resultado por la inversa de la dilución correspondiente, y obtener de esta forma el número de bacterias por mililitro de saliva.

Ejemplo: 36 colonias en el tubo 6

$$36 \times 1000\ 000 = 36\ 000\ 000\ \text{UFC}$$

FROTIS

1. Hacer un frotis de la saliva residual del tubo de ensaye sin diluir con un hisopo estéril, fijarlo al calor y teñirlo con la Técnica de Gram.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	78/185

TÉCNICA DE GRAM

1. Cubrir el frotis con Cristal Violeta 60 seg.
2. Lavar con agua
3. Aplicar Lugol 60 seg.
4. Lavar con agua
5. Decolorar con Alcohol-Acetona 2-4 seg.
6. Lavar con agua
7. Cubrir con Safranina al 0.5% 30 seg.
8. Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio, con aceite de inmersión.

RESULTADOS

1. Reporta el número de bacterias por ml. de saliva o unidades formadoras de colonias por ml. de saliva.
2. Reportar el tipo de microorganismos Gram + y Gram – y forma bacteriana que predominan en la saliva.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué importancia cree que tenga el hallazgo de un número de bacterias por mililitro de saliva superior al normal en un paciente?
2. Enliste por lo menos cinco características más importantes de la saliva.
3. ¿Cuál es el pH normal en saliva y que problemas sistémicos lo pueden variar?
4. Explique brevemente de qué forma ayuda la saliva en las siguientes funciones: Fonación, Deglución y Masticación.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	79/185

BIBLIOGRAFÍA

1. Ross Holbrook, Microbiología Bucal y Clínica, Editorial PLM Científica, Agosto 1989, México.
2. George W. Burnett, Henry W. Scherp, George S. Schuster, Manual Moderno de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de la boca, Ediciones Ciencia y Técnica S.A. Tomo 2 México 1987.
3. Paller Morton, Marcel Dekker, Inc, Oral Hygiene Products and Practice, Capítulo 3, New York 1988.
4. W. Nolte, Microbiología Odontológica, Editorial Interamericana, 4ta Edición México 1985.
5. Negroni Marta. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía práctica, Editorial Médica Panamericana 1°ed. 3° reimpresión. Buenos Aires, Argentina. 2004.
6. Marchesi and Ravel Microbiome (2015) 3:31 DOI 10.1186/s40168-015-0094-5
7. Varoni EM, Bavarian R, Robledo-Sierra J, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the microbiome for oral medicine specialists—Part 1. A methodological guide. *Oral Dis.* 2019;25(Suppl. 1):12-27.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	80/185

PRÁCTICA 11

IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE RIESGO PARA CARIES DENTAL

OBJETIVO

Analizar la importancia de la multifactorialidad del proceso carioso a partir de la relación de la prueba de Matsukubo y los índices epidemiológicos de IHOS y CPOD, para lograr la identificación de pacientes con riesgo de caries.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Definición de caries
2. Factores necesarios para el proceso carioso

FUNDAMENTO TEÓRICO

La caries dental es un proceso infeccioso, complejo, transmisible y multifactorial, ampliamente diseminada en la población, que por sus características de evolución, se considera una de las principales enfermedades que son la causa de la pérdida de los órganos dentarios. De aquí el interés de los profesionales de la salud bucal en prevenirla y prueba de ello, son todas las acciones que hasta la fecha se promueven de forma general a la población en diferentes servicios de salud y las campañas nacionales de salud bucal organizadas por la Secretaría de Salud.

En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) 2017, registró un CPOD promedio de 6.1 en pacientes de 18 años y se incrementa al doble entre los 35 a 44 años (12.5) y al triple en los adultos mayores de 65 a 74 años (18.1). A los 18 años, 80% de la carga del índice corresponde al componente cariado, en los adultos jóvenes de 35 a 44 años el componente caries aumenta (51.6%) Al estratificar por demarcaciones demográficas se observa que el CPOD fue de 12.6 para las zonas metropolitanas y 11.5 para las otras zonas urbanas. En los grupos de edad de menores de 1 año a 10 años, el índice de caries promedio fue de 3.66 de los cuales 3.34 fueron cariados, 0.06 perdidos y 0.26 obturados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	81/185

Paul Keyes estableció tres factores, a lo que se conoce como la Triada de Keyes, en donde deben interactuar simultáneamente para determinar la etiopatogenia de la caries dental: huésped (microorganismos), hospedero y sustrato. Aun cuando estos elementos se presenten en un momento específico, no se producirá una lesión cariosa sin un cuarto factor de riesgo, el tiempo (Newbrun, 1976).

Factor huésped

Existen diversas bacterias bucales de importancia en el proceso carioso. Los colonizadores iniciadores en la formación de la biopelícula bucal son estreptococos como *S. sanguinis*, *S. mitis*, y para la *biopelícula cariogénica*, se presentan *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *Veillonella ssp.*, entre muchas más.

En esta práctica con relación al número de bacterias, se llevará a cabo el recuento de estreptococos mutans en saliva por la técnica de Matsukubo y Col. Modificada. Esta técnica ha recibido gran aceptación, y a nivel comercial, ya existen pruebas para hacer el recuento no solo de estreptococos sino también de lactobacilos en saliva, que se pueden llevar a cabo en el consultorio dental, lo que facilita al profesional, llevar a cabo esta prueba como un medio predictivo con relación al proceso de caries en un individuo y aplicar o prescribir medidas preventivas.

Factor hospedero

Cuando hablamos del hospedero, se pueden mencionar varios factores relacionados que intervienen en la susceptibilidad a presentar lesiones cariosas como genéticos, hábitos dietéticos, anatomía, posición y composición dental, cantidad, características y composición de la saliva, así como hábitos higiénicos, presencia de aditamentos o restauraciones adecuadas o inadecuadas, entre otros.

La presencia de enfermedades sistémicas pueden estar relacionadas por sí mismas (como la diabetes) o por su tratamiento (como la hipertensión) con el riesgo de padecer caries. Por ejemplo en el caso de la diabetes, existe una descompensación del balance hídrico, lo que hace que la cantidad de saliva que normalmente se secreta por día, se disminuya, situación que favorece la instalación y metabolismo de microorganismos en las superficies dentales para la producción de caries; en el caso del tratamiento de pacientes que padecen hipertensión arterial, requieren de la toma periódica de antihipertensivos y se ha comprobado que algunos de ellos, producen resequedad bucal, lo que al igual que en el caso anterior, favorece la instalación y el metabolismo microbiano en las superficies dentales con la subsecuente desmineralización de los mismos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	82/185

Factor sustrato

La concentración y tipo de carbohidratos ingeridos, la frecuencia, así como la presencia continua de éstos en la cavidad bucal, aumentan la posibilidad de lesiones cariosas ya que descienden el pH salival de manera constante.

La sacarosa es un disacárido que al ser metabolizada por las bacterias, se disocia formando glucosa y fructuosa. Por una parte, la glucosa puede ser metabolizada a través de la glucólisis para proporcionar energía a las bacterias, mediante la formación de ácido pirúvico que posteriormente, entra a Ciclo de Krebs y a la fosforilación oxidativa. Por otra parte, la fructuosa entra a la glucólisis por otra ruta, donde la fructoquinasa cataliza la fosforilación de este carbohidrato convirtiéndolo en gliceraldehído, el cual, posteriormente, es convertido en gliceraldehído 3-fosfato para continuar con esta ruta metabólica.

Tanto la glucosa, como la fructuosa, son utilizadas por las bacterias para formar glucanos y fructanos, que sirven como polímeros extracelulares pegajosos que permiten la adherencia de las bacterias a las superficies dentarias e incluso, a otras bacterias para dar la coagregación bacteriana en la formación de la biopelícula dental, aunque también sirve como reserva de energía.

Finalmente, las bacterias bucales como estreptococos y lactobacilos, fermentan estos carbohidratos para producir ácido láctico que desmineraliza el esmalte dentario.

Factor tiempo

Los carbohidratos sirven de sustrato para que las bacterias lleven a cabo una fermentación y por lo tanto, producción de polímeros intracelulares que desmineralizan los dientes, por lo que requieren permanecer durante un tiempo determinado en la cavidad bucal.



Factores necesarios para el proceso carioso



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	83/185

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 Punta de pipeta Eppendorf limpia
- 1 Tubo con caldo mitis salivarius con bacitracina y telurito de potasio
- 1 Mechero
- 1 Tubo de kahn limpio
- 1 gradilla

EQUIPO

- Refrigerador
- Incubadora

SERVICIOS

- Luz, agua, gas

PROCEDIMIENTO

1. Una persona del equipo (de preferencia la misma a la que se le tomó la muestra de placa microbiana), colocará una muestra de saliva pequeña en el tubo de Kahn.
2. Tomar de la muestra de saliva, 100 microlitros y sembrarlos en el tubo de caldo mitis salivarius.
3. Incubar a 37°C durante 24 horas con una inclinación de 60° aproximadamente.
4. Después de 24 horas, colocar el contenido del tubo escurriéndolo bien y de una sola intención en un recipiente esterilizable.
5. Frente a una fuente de luz adecuada, se procede a contar el número de colonias en las paredes del tubo, reportando los resultados de la siguiente manera:



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	84/185

Porcentaje para el cariograma	Número de colonias en las paredes del tubo	Cruces	Correspondencia
0	No aparecen colonias en las paredes del tubo	-	No infectado (no existe S. mutans identificable en la saliva)
25	Si el número de colonias es menor de 10	+	Baja infección (menos de 30,000 células de S. mutans en saliva)
50	Si el número de colonias es mayor a 10 pero menor de 100	++	Moderada infección (entre 30,000 y 100,000 células de S. mutans en saliva)
75	Si el número de colonias es mayor de 100 pero menor de 300	+++	Alta infección (más de 100,000 células de S. mutans en saliva, pero menos de 1, 000 000)
100	Si el número de colonias es mayor de 350 dándole al tubo la apariencia de un cristal nevado	++++	Más de 1,000 000 de células de S. mutans en saliva)

6. Levantar el IHOS a la persona que donó la muestra de saliva.
7. Levantar el índice CPOD a la persona que donó la muestra de saliva.
8. Interrogar al donador acerca del padecimiento de enfermedades sistémicas y si actualmente se encuentra bajo tratamiento y en caso de ser afirmativo cual es el medicamento que está tomando y en que dosis.

RESULTADOS

Reportar los datos obtenidos y relacionarlos para identificar el riesgo de caries que presenta el paciente.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	85/185

CUESTIONARIO

1. Diga a qué se debe que los estreptococos se adhieran a las paredes del tubo.
2. En el caso de que la prueba se hubiera realizado en un niño de 10 años de edad, cuya dentición mixta se encuentra presente y el resultado del cariograma fuera de alto riesgo para caries, ¿cuál sería su actitud profesional con el paciente?

BIBLIOGRAFÍA

Almaguer, A. y Villagómez, J.G. Ecología oral. México: Manual Moderno; 2018.

Negroni, M. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.

Secretaría de Salud. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB 2017. Recuperado de:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/459279/SIVEPAB_2017.pdf

Valverde, C., Mendoza, C., Blanco, M.D., Ramírez, J. Fundamentos de Bioquímica Metabólica. México: Alfaomega Grupo Editor; 2005.

Walsh, L.J. y Tsang, A.K. Pruebas de bacteria cariogénica en el consultorio: conceptos y estrategias clínicas actuales. J. Minim Interv Dent. 2008; 1 (2): p. 128-154. Recuperado de:
<http://www.miseeq.com/s-1-2-7.pdf>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	86/185

PRÁCTICA 12

DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN DESINFECTANTE DE ALGUNAS SOLUCIONES DE USO COMÚN

OBJETIVO

Determinar la acción desinfectante de algunas soluciones de uso común a través de una prueba *in vitro* para observar su actividad antibacteriana.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Definición de bactericida y bacteriostático.

Métodos de desinfección de uso común y del área de la salud.

Flora bacteriana presente en instrumentos de atención dental y su importancia de desinfección.

Concepto de desinfección y esterilización.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El uso de agentes químicos como medio de prevenir infecciones se introdujo por primera vez en el campo de la medicina. En 1847, **Ignaz Semmelweis** notó la muy alta frecuencia de muerte por fiebre puerperal en la clínica y creyó que los médicos y practicantes eran los responsables por contaminar a los pacientes, lo cual disminuyó bastante la mortalidad al introducir el uso de una solución clorinada mezclada con limón. **Joseph Lister en 1867**, el padre de la cirugía aséptica, introdujo el uso de soluciones acuosas de fenol para tratamiento de heridas y para desinfectar el material quirúrgico, también para desinfectar la piel antes de operar.

La exposición de los microorganismos a concentraciones bajas, moderadas o altas, de agentes germicidas producen varios efectos que van del estímulo a la muerte. Esta variación en la actividad de los agentes germicidas sobre los microorganismos se refiere al espectro desinfectante, el cual puede ser separado en 3 zonas de acuerdo con el efecto del germicida. A extremadamente bajas concentraciones el agente puede no afectar al microorganismo. A concentraciones ligeramente más altas puede haber una estimulación del crecimiento. A concentraciones mayores se obtiene inhibición del crecimiento.

Una bacteria se considera muerta si es incapaz de multiplicarse en un ambiente óptimo. Cuando los microorganismos se exponen a ciertos agentes químicos como los mercuriales orgánicos por periodos cortos, pueden ser revividos si se cultivan en un medio que contenga grupos sulfhidrilo



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	87/185

libres, por tanto la acción de los mercuriales bajo estas condiciones, se considera bacteriostática. Un agente bacteriostático es el que inhibe la reproducción microbiana. Un agente bactericida es el que tiene una acción irreversible que resulta en muerte de la célula microbiana. Los germicidas y desinfectantes actúan como agentes bactericidas si se usan en concentraciones adecuadas, mientras que los antisépticos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos. La diferencia básica entre estos dos tipos de acción está determinada por la concentración y tiempo de exposición.

Las propiedades deseables de agentes químicos recomendados para desinfección son:

1. Habilidad para destruir a los microorganismos a bajas concentraciones en pocos minutos, poseer amplio espectro microbiano.
2. Permanecer estables en agua y otros vehículos sin perder su poder de matar.
3. Que no sean tóxicos para los tejidos (relativamente).
4. Buen poder de penetración a superficies donde se aplique y que no se combine con la materia orgánica.
5. Que no sean corrosivos y que no tiñan.

AGENTES QUÍMICOS

ÁLCALIS ACIDOS

Son activamente bactericidas, la presencia de moléculas no disociadas altamente permeables promueve la penetración del ácido dentro de las células.

SALES:

El cloruro de sodio se ha usado por muchos años como preservativo de carnes y pescados por impedir el crecimiento bacteriano.

METALES PESADOS:

Entre ellos Hg^{++} y Ag^+ encabezan la lista, siendo efectivos a menos de 1 ppm. Su acción antimicrobiana se debe a la combinación del ión metálico con ciertas proteínas de la célula microbiana; estas se inactivan, precipitan y finalmente producen la muerte.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	88/185

HALOGENOS (IODO)

Se combina irreversiblemente con proteínas, es un agente oxidante, es bactericida y se utiliza en la desinfección de piel o para heridas menores

AGENTES ALQUILANTES

Como el formaldehído o el óxido de etileno que reemplaza el débil enlace H de los grupos - NH₂ y - OH abundantes en proteínas.

Las reacciones del formaldehído son en parte reversibles, para la alta energía de los puentes epóxido de etileno permiten reacciones irreversibles. Estos agentes alquilantes en contraste con otros desinfectantes son tan activos contra esporas como con células vegetativas.

FENOL:

Su acción bactericida involucra la lisis celular. Los compuestos fenólicos son más activos mezclados con jabones que incrementan su solubilidad y promueven su penetración

ALCOHOLES:

La acción desinfectante de los alcoholes alifáticos incrementa con la longitud de su cadena. Su mecanismo de acción consiste en la desnaturalización de proteínas por inhibición de la producción de metabolitos esenciales. Aunque el alcohol etílico ha recibido mayor uso es mejor el alcohol isopropílico ya que es menos volátil y no está sujeto a las restricciones del alcohol etílico por poderse ingerir. Es más efectivo en la solución acuosa al 50 o 70% que absoluto.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO:

Su nivel de desinfección es alto. La acción antimicrobiana se debe fundamentalmente a la oxidación de los componentes de la célula microbiana.

El peróxido de hidrógeno en concentraciones del 6% y 10% posee altos niveles de actividad bactericida y esteriliza químicamente en inmersión durante 30 minutos, aunque en esas concentraciones es irritante para los tejidos y corrosivo para el instrumental.

En solución al 3% aún cuando su acción es limitada por la presencia de materia orgánica e inhibida por la catalasa de las bacterias y los tejidos, es útil en la antisepsia de las heridas y elimina mecánicamente restos de tejidos y microorganismos atrapados en ellas por el burbujeo que genera la liberación de oxígeno.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	89/185

MATERIAL y REACTIVOS

Yodo 5%

Benzal 6%

Alcohol 70%

Fenol 10%

Peróxido de hidrógeno al 3%

Jabón líquido de manos

2 Cajas de Petri con agar nutritivo

1 tubo con discos de papel filtro estériles

1 asa bacteriológica

1 gradilla

CEPAS

Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

EQUIPO

Incubadora, refrigerador

SERVICIOS

Luz, agua y gas

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar masivamente con una asa estéril Salmonella typhi, en una caja de agar nutritivo etiquetar con el nombre de la cepa, y la otra caja con Staphylococcus aureus.
2. Humedecer 1 disco de papel filtro, con una de las soluciones desinfectantes proporcionadas.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	90/185

- Colocar el disco humedecido sobre una porción de la caja sembrada masivamente. Realizar el paso 2 y 3 con cada una de las soluciones y repartir los discos alrededor de la caja, etiquetando previamente con el nombre de cada solución.
- Incubar durante 24 horas a 37°C. Observar si hubo inhibición de crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Reportar el tamaño del diámetro en milímetros, del halo de inhibición que se presenta en las cajas de Petri.

MICROORGANISMO	YODO	BENZAL	H ₂ O ₂ 3%	FENOL	JABÓN	ALCOHOL
<i>Salmonella typhi</i>						
<i>Staphylococcus aureus</i>						

Concluya acerca de la acción de los agentes químicos utilizados de acuerdo a sus resultados

CUESTIONARIO

- ¿Qué es el coeficiente fenólico y cuál es su utilidad?
- ¿Cuál es la diferencia entre agente bactericida y bacteriostático?
- ¿Qué características debe tener un desinfectante para esterilizar instrumental y cuáles para desinfectar piel?



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	91/185

BIBLIOGRAFÍA

1. -D.Davis; Dulbecco Renato; N.Eisen H; Ginsberg HS. Tratado de Microbiología.4ª ed. Editorial Masson. Barcelona. 1996: 58-59
2. -Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. Microbiología Médica de Jawetz 16ºed. Editorial El Manual Moderno. México, 1999. 179-216.
3. Ryan K.J. Ray C.G Sherris Microbiología Médica 4º ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México 2004. 193-202
4. <http://www.encolombia.com/medicina/ginecologia/obste52101-ignaz.htm>
5. Marta Negroni. Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999: 85-100
6. Palanca Sánchez I, Ortiz Valdepeñas J, Elola Somoza J, Bernal Sobrino JL, Paniagua Caparrós JL. Unidad central de esterilización: estándares y recomendaciones. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad; 2011.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	92/185

PRÁCTICA 13 ESTRUCTURA EUCARIÓTICA DE HONGOS

OBJETIVO

Establecer las características estructurales de los organismos eucariotes mediante la observación de preparaciones fijas y su crecimiento en cultivos puros para diferenciarlos de los microorganismos procariotes.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Diferencia entre organismos procariotes y eucariotes
Concepto de hongo
Clasificación clínica de los hongos
Hongos de importancia en cavidad oral y la enfermedad que producen

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos se encuentran dentro del reino Fungi de acuerdo con la clasificación de Whittaker, las propiedades de mayor relevancia de este reino son que todos los organismos están compuestos por células eucariotas (el material genético se encuentra rodeado por una membrana), se nutren por absorción. Los hongos se pueden agrupar de dos formas (Ver Figura 13.1), hay hongos unicelulares (como levaduras) o multicelular (hongos filamentosos).

Los protozoarios, se encuentran ubicados en el reino protista según la clasificación de Whittaker, son organismos microscópicos, unicelulares eucariotas, que viven en ambientes acuosos, se pueden reproducir de forma asexual y sexual, cuentan con cromosomas múltiples y aparato mitótico. En la tabla I se encuentran las principales diferencias entre organismos eucariotes (hongos y protozoarios) y procariotes (bacterias).

CARACTERÍSTICAS	PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
Glucopéptidos en la pared celular	+	-
Esteroides en la membrana celular	-	+
Mesosomas	+	-
Membrana nuclear	-	+
División celular	-	+
Cromosomas	UNO SOLO	MÚLTIPLES
Complejo dna-histonas	-	+
Organelos citoplásmaticos	-	+
Nucleolo	-	+

Tabla I. Principales diferencias entre células procariotas y eucariotas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	93/185

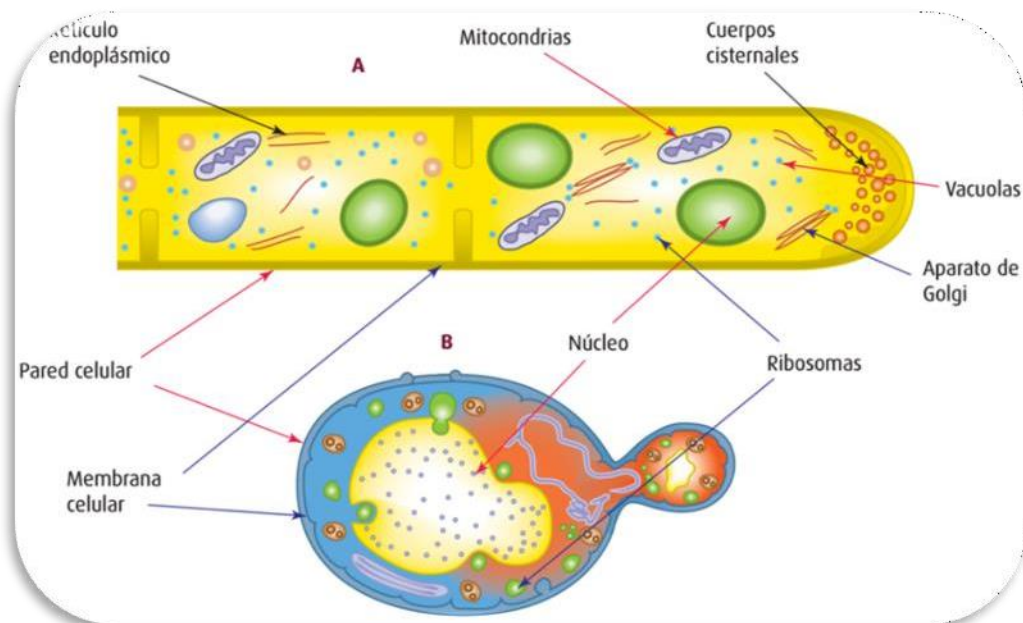


Figura 13.1 Diferencias entre hifa A y levadura B, tomada de Bonifaz A. Micología Médica Básica Mc Graw Hill-Interamericana. 2012.

Las características generales de los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, con membrana nuclear bien definida, son aerobios, presentan organelos citoplasmáticos (mitocondrias, sistema endomembranoso, dictiosomas,). Los hongos poseen una pared celular que su principal componente es la quitina (N-acetilglucosamina) y tiene como función principal dar rigidez al hongo, la membrana celular está compuesta principalmente de ergosterol.

Los hongos se pueden clasificar de acuerdo con el aspecto macroscópico que presentan y se pueden dividir en cuatro grupos:



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	94/185

A) Hongos macroscópicos o setas



B) Mohos u hongos filamentosos



C) Levaduras u hongos de crecimiento limitado



D) Actinomicetos o bacterias filamentosas de crecimiento limitado y rocoso



Tabla II Clasificación de su crecimiento según la apariencia de crecimiento macroscópico. Tomadas Bonifaz A. Micología Médica Básica Mc Graw Hill-Interamericana. 2012.

Los hongos macroscópicos y filamentosos están compuestos por unidades fundamentales llamadas hifas (filamento), las hifas se caracterizan por tener una pared rígida que su principal componente es la quitina. Cuando un grupo de hifas se unen entre ellas reciben el nombre de micelio o talo (Ver tabla II).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	95/185

El micelio se puede clasificar de muchas maneras, puede presentar o no divisiones, al micelio que presenta divisiones se le conoce como micelio septado o tabicado, mientras que al micelio que no presenta divisiones se le conoce como micelio cenocítico o no tabicado.

El micelio se puede dividir de acuerdo con su función que desempeña, hay dos funciones fundamentales que debe de llevar acabo el micelio, son la captación de nutrientes y la reproducción del hongo, el micelio encargado de la absorción y transformación de nutrientes se le conoce como micelio vegetativo o de nutrición, mientras que el micelio encargado de soportar las estructuras y formas de reproducción se le conoce micelio reproductivo.

Otra de las características importantes del reino Fungi es que se puede reproducir de forma sexual o asexual, hay diferencias importantes entre las dos formas de reproducción en los hongos, la reproducción sexual (teleomórfica) se caracteriza por el intercambio de material genético por lo tanto esta forma de reproducción tiende a facilitar procesos como evolución y mejora de propiedades, la reproducción sexual producirá estructuras llamadas esporas (Ver tabla III), son tres las esporas sexuales (Ascosporas, Basidiosporas y Zigosporas), los hongos que tienen la capacidad para reproducirse de forma sexual se le conoce como hongos meiospóricos.

Esporas Sexual

Descripción

Ejemplo

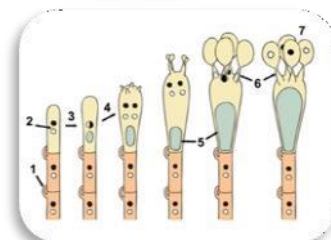
Ascosporas

Se forman dentro de una bolsa o asca que resulta de la fusión sexual de dos células especializadas. Cada asca tiene 4 a 8 esporas, propias de los Ascomycetes



Basidiosporas

Propias de las setas u hongos macroscópicos, son estructuras unicelulares y haploides; se forman de una bolsa o basidio, de la que nacen esterigmas que producen las basidiosporas.





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	96/185

Zigosporas

Se forman por la unión de dos hifas sexualmente diferenciadas, donadoras (+ o mayor) y receptoras (– o minor), aunque son iguales en su morfología

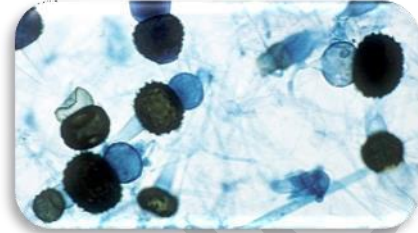


Tabla III Estructuras de reproducción de origen sexual.

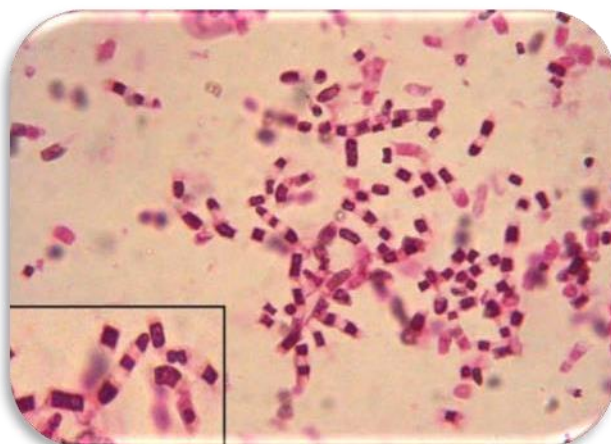
La reproducción asexual o anamórfica tiene como objetivo primordial el mantenimiento de la especie, los hongos que se producen por medio de esta forma de reproducción son hongos genéticamente idénticos al progenitor, no se lleva intercambio genético y se llevaba a cabo por mitosis (hongos mitospóricos), la forma de reproducción asexual producirá estructuras llamadas conidios (Ver tabla IV).

Las estructuras de reproducción tanto sexuales como asexuales difieren mucho en forma, color, tamaño, el número de núcleos. La morfología microscópica de origen (sexual o asexual), son las características principales y de mayor relevancia para la clasificación de los hongos, pero es mucho más relevancia en los hongos de origen asexual, muchas de las estructuras de reproducción serán únicas en algunas especies. Algunas especies tienen la capacidad de producir hasta cuatro diferentes estructuras de reproducción.

**ESTRUCTURA DE
REPRODUCCIÓN ASEXUAL**

IMAGEN

Arthroconidios: Son conidios que se forman de la fragmentación de las hifas, se caracterizan por ser hifas terminales que al madurar se separan, la forma de estos conidios es singular, son de forma cuadrada o rectangulares con una pared gruesa.



Arthroconidios de *Coccidioides immitis*.

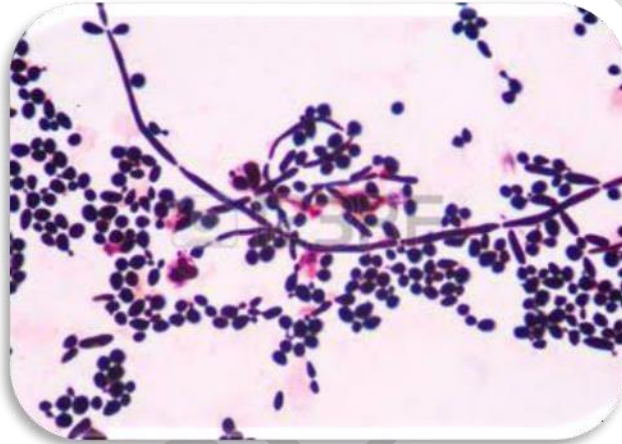


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	97/185

Blastoconidios: Son conidios que se forman por la gemación de una levadura y se le conoce como pseudomicelio.



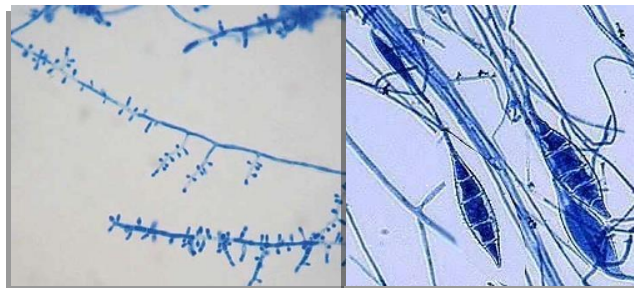
Blastoconidios de *Saccharomyces* sp.

Clamidioconidios: Son conidios que se crean del engrosamiento de las hifas, pueden ser intercalares o terminales, no se consideran estructuras de reproducción, sino de resistencia, este tipo de estructuras se van a lograr observar cuando el hongo se desarrolle en condiciones adversas.



Clamidioconidios de *Candida albicans*.

Aleuroconidios: Son conidios que se forman directamente de las hifas, pueden ser unicelulares (microaleuroconidios) ó pluricelulares (macroaleuroconidios)



Microaleuroconidios de *Trichophyton tonsurans* (izq.)
Macroaleuroconidios de *Microsporum canis* (der.)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	98/185

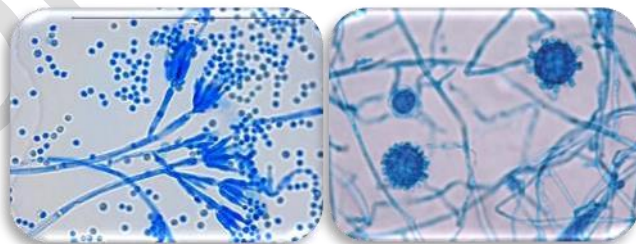
Esporangioesporas o endoesporas: Son conidios formados dentro de una membrana o esporangio, cuando las esporas alcanzan su madurez, la membrana se debilita y se rompe.



Esporangioesporas de *Mucor sp.*

CONIDIOS

Microconidios: Son conidios unicelulares y se presentan de diferentes formas, por lo regular crean cadenas.
Macroconidios: Son pruricelulares, polimorfos y de mayor tamaño que los microconidios.



Microconidios de *Penicillium sp.* (izq.)
Macroconidios de *Histoplasma capsulatum* (der.)

Tabla IV Estructuras de reproducción asexual imágenes tomadas de Bonifaz A. Micología Médica Básica Mc Graw Hill-Interamericana. 2012.

Las levaduras son muy fácilmente de distinguir de los hongos filamentosos, la principal diferencia es que las levaduras tienen un crecimiento cremoso o bacteriforme, muchas de las especies de hongos levaduriformes no se pueden distinguir a simple de las bacterias.

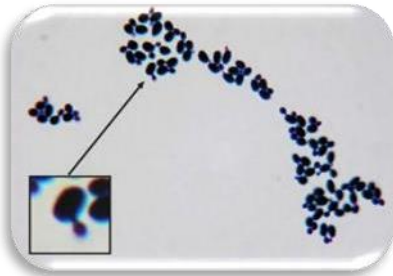
Dentro de los hongos levaduriformes hay una especie patógena en particular que sobresale de las demás especies, *Candida albicans* es una levadura que esta compuesta por cuerpos unicelulares ovalados que pueden producir pseudomicelio. Estas bacterias son dimórficas porque pueden estar en una fase levaduriforme y una fase filamentosa (clamidioconidios). Generalmente se reproduce por gemación.



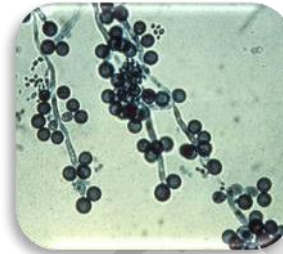
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	99/185



Fase levaduriforme de *Candida albicans*



Fase filamentosa (clamidioconidios) de *Candida albicans*

Tabla IV *Candida albicans* fenómeno de dimorfismo

La estructura de los protozoarios es muy simple ya que son organismos unicelulares, que están comprenden una gran cantidad de subphylum, hay dos principales subphylum que tienen mayor importancia en cavidad bucal y son los subphylum Mastigophora y Sacodina.

Trofozoito de *Entamoeba gingivalis*, posee un núcleo y un gran número de vacuolas.

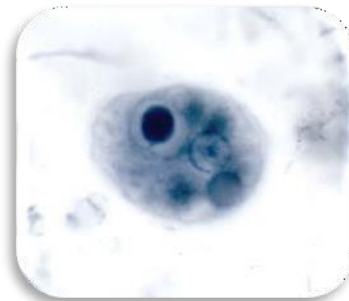


Figura 1 *Entamoeba gingivalis*



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	100/185

ORGANISMO	MORFOLOGÍA	ENFERMEDAD EN CAVIDAD ORAL
HONGOS		
<i>Microsporium sp.</i>	Macroconidias fusiformes al final de la hifa	
<i>Trichophyton sp.</i>	Microconidias en forma de racimo de uvas.	Dermatitis labial
<i>Epidermophyton sp.</i>	Macroconidias multiseptadas en grupos	
<i>Candida albicans</i>	Levadura con blastoconidios y producción de pseudomicelio	Algodoncillo
<i>Geotrichum sp.</i>	Células rectangulares	Infección crónica de amígdalas
<i>Criptococus sp.</i>	Levadura monofásica	infección oportunista, úlcera del paladar, lesiones granulomatosas en lengua.
<i>Coccidioides immitis</i>	Difásico, levaduriforme y micelio septado, artroconidios	Papiloma labial y úlceras, granulomas.
<i>Blastomomyces dermatitidis</i>	Dimorfo, levaduriforme. micelio septado y producción de blastoconidios	Úlceras en mucosas oral
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Dimorfo, levaduriforme (multigemante), micelio septado y producción de blastoconidios	Granuloma dental después de extracción.
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Dimorfo, levaduriforme y micelio septado con macroconidias	Úlcera de borde indurado en lengua, ápice dental y paladar.
<i>Aspergillus sp.</i>	Oportunista, vesícula, fiálides y conidios	Lesión en seno maxilar, sinusitis, paladar blando, epiglotis.

Tabla V se muestran los principales organismos eucarióticos y su relación con patologías de la cavidad bucal.



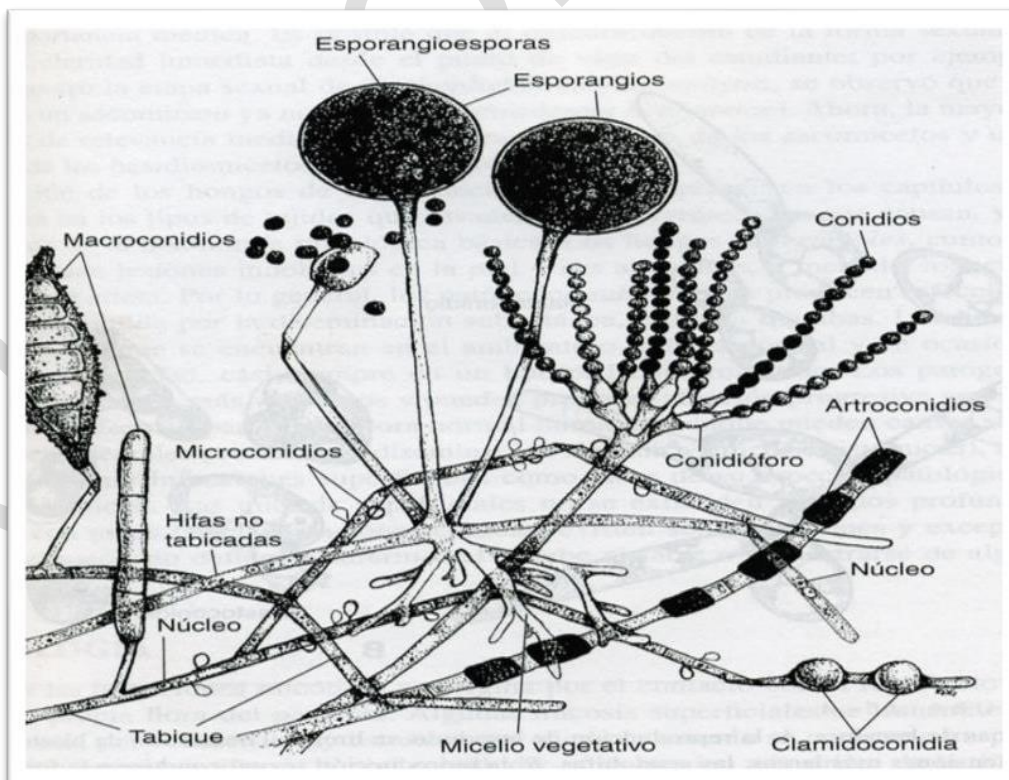
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	101/185



Algodoncillo en niño (*Candida albicans*), enfermedad frecuente en los niños.



Algodoncillo en adulto (*Candida albicans*) Asociado a VIH, en los adultos el algodóncillo no se debe presentar





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	102/185

MATERIAL Y REACTIVOS

Preparaciones fijas de las siguientes cepas de hongos:

Trichophyton sp (Micelio y clamidosporas)
Microsporum sp (Micelio y macroconidias)
Geotrichum sp (Micelio y artrosporas)
Aspergillus sp (Micelio, cuerpo fructífero, conidias)
Alternaria sp (Micelio y macroconidias)

Cepa de *Candida sp*
Micro cultivo de *Penicillium sp*
1 tubo con crecimiento de una cepa de hongos por mesa
2 Portaobjetos
1 Cubreobjetos
Asa bacteriológica
1 pinza de curación
1 mechero
1 gradilla
1 frasco con azul de metileno
1 equipo de Gram
Formol 10%

EQUIPO

Microscopio
Refrigerador

SERVICIOS

Luz, agua, gas.

PROCEDIMIENTO

1. Observar al microscopio con el objetivo de 40X, las preparaciones fijas de hongos.
2. Observación macroscópica de la morfología colonial de los tubos con crecimiento de una cepa de hongos. (Sin abrir)
3. A partir del microcultivo, practicar la tinción simple:
 - a. Con una pipeta Pasteur, desechar el glicerol y sustituirlo por formol al 10%. Dejar actuar por 1 hora.

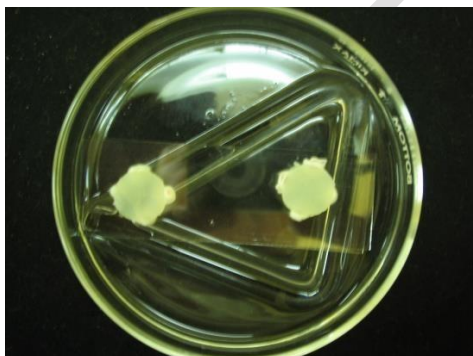


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	103/185

- Colocar una gota de azul de metileno en el centro de un portaobjeto limpio y desengrasado.
- Con unas pinzas, separa el cubreobjetos del microcultivo
- Colocar el cubreobjeto sobre la gota de colorante y presionar un poco sobre el cubreobjetos con el fin de eliminar las burbujas de aire. .
- Observar al microscopio con los objetivos 10X y 40X.
- A partir del porta objetos, se puede obtener otra preparación, quitando el medio de cultivo del porta objetos con una aguja de disección.
- Colocar una gota de colorante en el centro del crecimiento y colocar un cubre objeto limpio y presionar.
- Observar al microscopio



Ejemplo de microcultivo

(Foto: cortesía de QFB. Patricia Vidal Millán, QFB. Pablo Juárez de los Santos)

4. Observación de un hongo levaduriforme (*Candida sp*)

- En un porta objeto limpio, colocar una gota de agua con el asa.
- Cerca del mechero, tomar una asada del cultivo *Candida sp.* y homogenizar en la gota de agua, extendiendo procurando hacer un frotis delgado.
- Dejar secar al aire y fijar al calor, pasando dos o tres veces al portaobjetos por la flama del mechero.(rápido)
- Realizar la tinción de Gram.
- Dejar secar al aire y observar al microscopio con el objetivo de 100X.

RESULTADOS

- Colocar las imágenes de la morfología microscópica de los hongos observados, señalando cuales son levaduras, tipos de esporas y micelio.
- Describe la morfología macroscópica del hongo señalándola en la fotografía que obtenga de los tubos con crecimiento.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	104/185

CUESTIONARIO

1. Principal diferencia entre un moho y una levadura
2. ¿Qué es un microcultivo y para qué se utiliza?
3. ¿Qué es un protozooario y cuáles son los de importancia odontológica?
4. ¿Qué es una Tinción simple y cuál es su utilidad?
5. Compare entre las bacterias, hongos y parásitos que observó ¿cuáles son sus diferencias?

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid España. Editorial Mc Graw Hill. 2002: 11-43
2. Marta Negroni. Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999: 58-69
3. D.Davis; Dulbecco Renato; N.Eisen H; Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. Editorial Masson. Barcelona. 1996: 707-733
4. <http://www.mdpaquarium.com.ar/revista/explorando04-oct00.htm>
5. <http://www.cdeea.com/identificacion.htm>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	105/185

PRÁCTICA 14

MANEJO DE MATERIAL DE VIDRIO EN EL LABORATORIO

OBJETIVO:

Reconocer y manejar en forma adecuada el material de vidrio del laboratorio por el alumno para el buen desarrollo de las prácticas de bioquímica

FUNDAMENTO TEÓRICO.

Para la realización de las prácticas en este laboratorio, es necesario recordar los nombres de los diversos instrumentos y equipo, así como también, su función, cuidados y modo de empleo, ya que dependerá de la habilidad, interés y buen uso que del material se haga, los resultados de las mismas.

El material de vidrio es delicado y requiere de una adecuada utilización, además del conocimiento de que para realizar una mezcla de soluciones, se utiliza ya sea un matraz volumétrico, que también nos sirve para medir una determinada cantidad de solución, o bien se puede emplear un matraz Erlenmeyer en caso de requerir además de mezclar, contener una determinada solución

Cuando se requieran medidas exactas, entonces se podrán utilizar tanto pipetas, como probetas, entre otros.

El manejo de datos exactos en el laboratorio, está dado por la precisión con la que se miden las diversas sustancias con las que se realizan los procedimientos de laboratorio; la utilización del material de vidrio en forma adecuada permite en gran medida obtener datos confiables.

Los estudios de laboratorio en los que se ven reflejados estos resultados pueden ser: biometría hemática, química sanguínea, concentración de algunas enzimas séricas, e identificación de algunos componentes dentales, entre otros.

Estos instrumentos están hechos con materiales que soportan determinada presión y temperatura; por lo que se debe reconocer el material adecuado para realizar cada práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	106/185

Pipetas. Son cilindros de vidrio de pequeño diámetro y con abertura en sus dos extremos. Se pueden encontrar diversos tipos, dentro de los cuales están:

Volumétricas. éstas pueden ser aforadas por vertido, tienen un bulbo y limitan el volumen con una marca superior, pueden presentar una marca inferior, el extremo inferior termina en punta y el superior tiene un ensanchamiento con el fin de que los líquidos no alcancen la boca, se pueden encontrar en diferentes tamaños de acuerdo a su capacidad.

Serológicas. Consisten en un tubo de vidrio de diámetro uniforme marcado a intervalos regulares. Los intervalos entre las marcas de calibración dependen del volumen de la pipeta. Se llenan introduciendo la punta en el líquido y succionando por el otro extremo, con el pipeteador girando la rueda se logra un manejo preciso en la aspiración y dispensación de líquidos con el dedo y presionando la palanca lateral se logra un rápido dispensado del contenido completo. También se pueden pipetear por medio de succión de perillas de seguridad, las cuales por efecto de contracción, expulsan el aire de la pipeta y al dilatarse succionan el líquido,

Para vaciar las pipetas, se colocan en forma vertical tocando con la punta la pared de la vasija receptora y se mide el volumen observando la base del menisco de una marca a otra o hasta el límite requerido. Líquido en la punta, nunca se debe soplar para expulsar.

Buretas.- Es un recipiente de vidrio parecido a la pipeta graduada; puede estar graduada en cm^3 o en $1/10$ de cm^3 , con una llave de paso y pinza en su parte inferior. Se utiliza para medir en forma exacta cantidades variables de líquido. Para trabajar con ella primero se debe verificar que este perfectamente limpia y seca, colocarla en un soporte universal con unas pinzas para bureta con la punta hacia abajo y verificar que la llave está cerrada. Se deben llenar por la parte superior agregando el líquido mediante un embudo; al igualar a 0 se debe tener cuidado de que el desagüe de la bureta esté libre de burbujas y las lecturas se deben hacer unos 30 segundos después de haber extraído el líquido. Al igual que con las pipetas, la lectura se hace siempre con la parte inferior de menisco.

Matraz Aforado o volumétrico.- Es un recipiente en forma de pera, con base plana cuello largo, en el cual se encuentra la marca o aforo, de su capacidad, a diferencia de los otros utensilios volumétricos, no emite sino que contiene el volumen indicado. Los matraces volumétricos están calibrados para contener el volumen especificado a una temperatura dada, generalmente a 20°C . Un buen matraz tendrá un cuello estrecho, tapón esmerilado y una marca de nivel en el cuello, la cual permita ajustar bien el menisco para aforarlo exactamente. Todas las lecturas se hacen con la parte inferior del menisco.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	107/185

Cuando se prepara una solución, es importante asegurarse de que los sólidos estén completamente disueltos antes de aforar el matraz.

Si un matraz aforado se calienta, deja de ser un aparato volumétrico para convertirse simplemente en un recipiente.

Matraz Erlenmeyer.- A diferencia del matraz volumétrico, este tiene la forma de un cono de base inferior y punta amplia. Se emplea mucho para hervir líquidos, ya que tiene una superficie grande de calefacción en la base, con lo que se logra que la ebullición sea más rápida. También se emplean en titulación y para preparar soluciones ya que por su forma, facilita la agitación sin que se derramen los líquidos tan fácilmente.

Probeta.- Es un cilindro de vidrio de un diámetro grande, sostenida por una base cilíndrica o hexagonal que puede ser de vidrio o de plástico. Su capacidad está dada por la última graduación, puede ser desde 5ml hasta 2000ml a 20°C. Nos sirve para hacer mediciones rápidas con exactitud, sirve para trasvasar líquidos rápidamente. Es graduada para medidas de volumen, cuya escala está dividida según el volumen de la probeta. Para no cometer error de lectura se colocan en forma vertical y paralela a los ojos del observador.

No se pueden usar en lugar de las pipetas o buretas, puesto que solamente miden el volumen aproximado.

Tubos de ensayo.- Los tubos de ensayo se utilizan en la práctica para diversos tipos de análisis. No se deben calentar por el fondo, sino cerca de la superficie del líquido y en forma inclinada para que éste no salga proyectado. Se les puede calentar directamente a la flama, retirándolos periódicamente para agitarlos y deberán estar secos por su cara exterior, ya que de lo contrario se romperían con suma facilidad. Para sostener los tubos se utilizan distintos materiales, según el caso: pinzas, gradillas o soportes de pie.

Vaso de precipitado.- Los vasos de precipitado o “beakers conocidos también como vasos de Berlín”, son los equivalentes en el laboratorio a las ollas en la cocina. Sirven para múltiples propósitos tales como contener, calentar, enfriar, disolver, mezclar, hacer reaccionar, entre otros. Estos recipientes son muy útiles y versátiles pero deben protegerse de los golpes accidentales, su principal causa de deterioro. Aunque tienen una graduación, su precisión es muy baja; se trata simplemente de vasos de vidrio con borde superior al estilo de jarra para facilitar el vertido de su contenido. Sus capacidades varían ampliamente desde los 50 hasta 5 000 ml.; son de forma cilíndrica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	108/185

Termómetro de Mercurio.- Se utiliza para medir la temperatura de un cuerpo o recinto y determinan temperaturas comprendidas entre 30 y 300°C, límites impuestos por la temperatura de solidificación y punto de ebullición del mercurio (- 38.8°C/+357 °C). Algunas causas de error en la medida de la temperatura con termómetros de mercurio:

- 1) Envejecimiento del vidrio
- 2) La resistencia que opone el capilar al movimiento del mercurio.
- 3) Evaporación del mercurio cuando las temperaturas son altas.
- 4) La falta de tiempo para que la columna se estabilice.
- 5) Error debido a una falsa lectura o errores de paralaje.

Mecheros.- La calefacción es una de las operaciones más frecuentes en los trabajos de laboratorio, por lo cual la utilización del gas como medio de calefacción es el más generalizado y cómodo.

Existen diversos mecheros como el Bunsen y Fisher. Generalmente son metálicos, la altura y dimensión de los mismos varían desde los pequeños hasta los 18 ó 20 cm. De altura.

El **mechero Fisher**, se emplea para temperaturas muy elevadas. La temperatura máxima de la llama se logra regulando la entrada de aire de manera que sea algo mayor que la requerida, para producir llama no luminosa es aconsejable usar una rejilla metálica con tela de asbesto sobre un tripié cuando se calienta directamente un recipiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	109/185

MATERIAL Y REACTIVOS

1 pipeta de 0.1 ml
1 pipeta de 1.0 ml
1 pipeta de 5.0 ml
1 pipeta de 10.0 ml
4 tubos de ensayo de 13 x 100
4 tubos de ensayo de 18 x 150
1 gradilla
1 perilla de seguridad
1 vaso de precipitado de 50 ml
1 vaso de precipitado de 100 ml
1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
1 matraz de Erlenmeyer de 100 ml
1 probeta de 100 ml
1 matraz aforado de 100 ml
1 embudo de vidrio
1 pinzas para tubo de ensayo
1 bureta de 50 ml
1 soporte universal
1 piseta

Reactivos:

Cloruro de sodio

Solución Azul de metileno de concentración 10 mg/ml.

Ácido clorhídrico 0.1 M

Hidróxido de sodio 0.1 M

Solución Fenolftaleína

Agua destilada



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	110/185

SERVICIOS

Luz, Agua

PROCEDIMIENTO

1. Pipetear diversas cantidades de agua en los tubos de ensayo, y en la probeta, de acuerdo a las instrucciones del profesor.
2. Disolver los solutos según indique el profesor utilizando pequeñas cantidades de cloruro de sodio, adicionando agua en cantidades diferentes a los diversos matraces y vasos disponibles. Anote sus resultados.
3. Realizar una titulación, utilizando la bureta llena con ácido clorhídrico 0.1M colocada en un soporte universal, adicionándolo gota a gota en un matraz Erlenmeyer que a su vez contenga 15 ml de hidróxido de sodio 0.1M y 2 gotas de reactivo de fenolftaleína bajo las instrucciones del profesor.
4. Realizar un aforo a 100 ml con 2 ml de azul de metileno en un matraz aforado.

RESULTADOS

1. Reportar los resultados enfatizando las características de los diversos materiales empleados.
2. Realizar el esquema de la titulación y reportar la cantidad de ácido clorhídrico utilizado en la titulación.
3. Esquematice el aforo del matraz con azul de metileno.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es el error de paralaje?
- 2.- ¿Qué es una titulación?
- 3.- ¿Cuáles son las diferencias entre los matraces y vasos de precipitados?
- 4.- ¿Cuál es la forma adecuada para manejar una pipeta? (Haga un dibujo)
- 5.- ¿Qué tipo de material se emplea para la fabricación del material de vidrio utilizado en el laboratorio?



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	111/185

BIBLIOGRAFÍA

- Montes de Oca, P. Instrumentos de un laboratorio de química. México. Editorial VicMont; 1977.
- Oppenheim I. Manual para técnicos de laboratorio. México. Editorial Panamericana; 1973.
- Plummer D. Bioquímica práctica. México. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana; 1981.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	112/185

PRÁCTICA 15 MANEJO DEL EQUIPO DE LABORATORIO

OBJETIVO

Identificar las partes y el funcionamiento del equipo de laboratorio para el manejo adecuado y mantenimiento preventivo, que le permita al alumno realizar sus prácticas de laboratorio.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Para el desarrollo de la práctica es necesario que desarrolles los siguientes conceptos:

- Longitud de onda
- Tarar
- Sensibilidad
- Exactitud

FUNDAMENTO TEÓRICO

La presente práctica permite al alumno integrar la función del laboratorio con los conceptos teóricos, ya que establece un vínculo de lo formativo a lo operativo, le permite reconocer la importancia del laboratorio clínico, como apoyo para integrar un diagnóstico.

Además de ubicar y reconocer los diferentes equipos de laboratorio.

Durante la atención a los pacientes el uso de auxiliares de diagnóstico, tales como los análisis clínicos de laboratorio juega un papel primordial en el establecimiento del diagnóstico, plan de tratamiento.

En el caso del cirujano dentista para la realización de procedimientos quirúrgicos es necesario solicitar biometría hemática o bien determinación de química sanguínea, ambos estudios se realizan mediante la toma de muestra sanguínea, para posteriormente separar sus contenidos.

Para poder procesar dichas muestras, el laboratorio clínico se basa en los siguientes métodos de análisis instrumental:

- Métodos ópticos de análisis.
- Métodos electrométricos.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	113/185

Dentro del **método óptico de análisis** podemos mencionar la espectrofotometría.

Espectrofotómetro

El **espectrofotómetro** es una fuente luminosa, que permite la cuantificación de biomoléculas, la cual se orienta en forma específica sobre una superficie receptora (celdillas fotoeléctricas), que puede seleccionar la frecuencia o longitud de onda de dicha luz, además, cuenta con una celda o cámara en donde se coloca la muestra a medir (porta muestras) esta muestra tiene un color determinado que deberá de corresponder a la longitud de onda elegida para su lectura, siguiendo en forma lineal se encuentra un detector que mide la cantidad de la luz que logra pasar a través de la muestra, para ser medida y registrada.

De lo anterior se reconoce entonces una cantidad de luz absorbida (la que se encuentra dentro de la muestra), y una cantidad de luz transmitida (aquella que logra pasar a través de la muestra); la cantidad de luz absorbida depende directamente de la concentración de la sustancia que vamos a medir o registrar, a esta se le denomina **absorbancia**, por otra parte la fracción de luz que logra cruzar a través de la muestra se le denomina **transmitancia**.

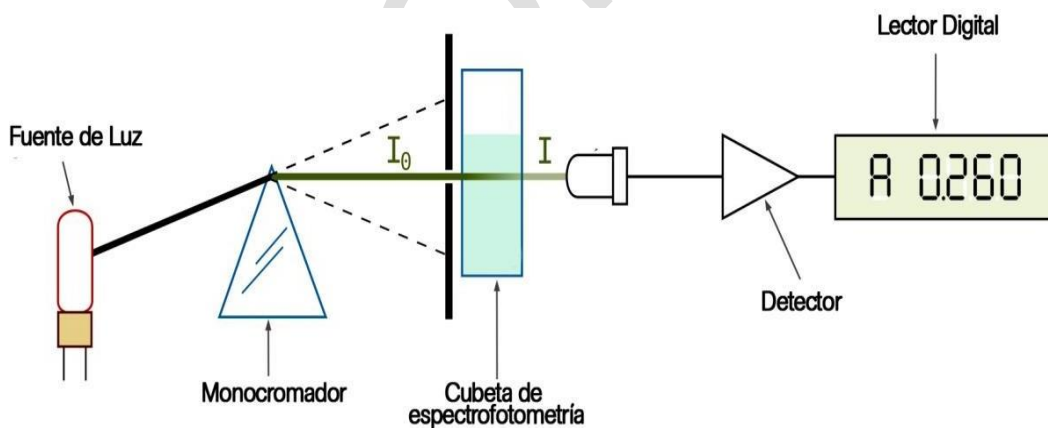


Figura 15.1 Funcionamiento del espectrofotómetro



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	114/185

Para que sea posible medir entonces una sustancia, se requiere de una coloración específica, ya coloreada dicha solución deberá de cumplir con una ley denominada de “**Lambert y Beer**”, en la cual se refiere que: “La cantidad de luz absorbida por una sustancia es directamente proporcional a la concentración del compuesto colorido de dicha sustancia”

El **espectrofotómetro** tiene dos escalas de medición una para la absorbancia y otra para la transmitancia, la característica de la escala de la transmitancia es que siempre será menor al valor de 100, en el caso de los analógicos, ya que los espectrofotómetros digitales dan el resultado directo.

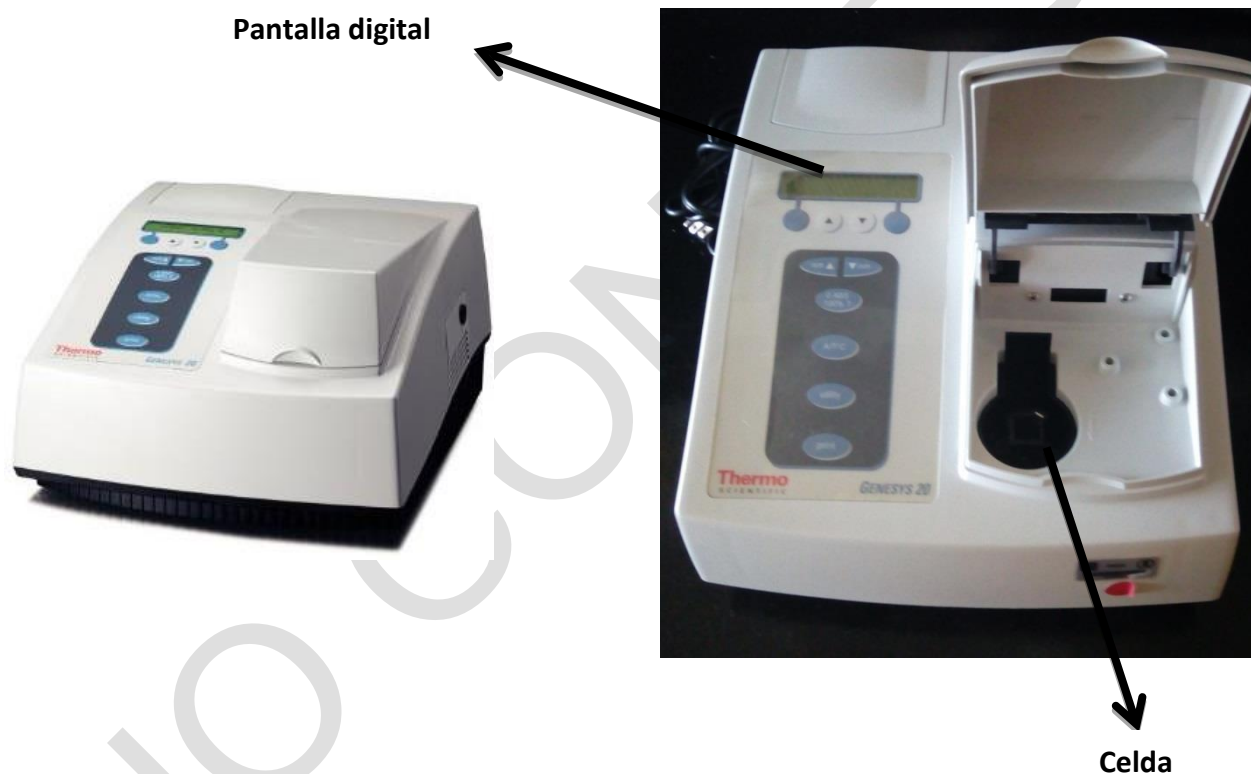


Figura 15.2 Partes del espectrofotómetro

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	115/185

POTENCIÓMETRO

Otro método de análisis son los electrométricos ejemplo de ello la potenciometría para el cual se emplea el **potenciómetro**, que es un aparato para medir la fuerza eléctrica de las sustancias, dada por la difusión de los iones hidrógeno, al portar carga eléctrica dichos iones reciben el nombre de hidrogeniones.

Las partes del potenciómetro se reconocen fácilmente tiene un brazo móvil que porta dos tubos, uno de los tubos presenta su terminación con un bulbo sellado y en su interior contiene una solución ácida estable, sensible a los cambios de hidrogeniones que transmite su carga a través de un alambre de platino.

El otro tubo tiene una terminación porosa que se pondrá en contacto con la solución a medir, y en el interior se encuentra un bulbo de mercurio con una pasta de calomel, que también transmite los cambios de cargas eléctricas a través de un hilo de platino que se encuentra sumergido en una solución de cloruro de potasio.

Al sumergir ambos electrodos en una solución problema se establece un circuito eléctrico que capta la movilización de hidrogeniones de la solución problema, a través del electrodo poroso, transformando la energía química en energía eléctrica para poder medir dicha energía en una celda eléctrica y registrar el resultado.

Con el potenciómetro podemos medir el pH de la saliva, del sudor, de la sangre, la orina, así como también de los medicamentos y poder entender más fácilmente su aplicación clínica o bien estados patológicos que alteran a las funciones orgánicas con los cambios de pH.



Figura 15.3 Potenciómetro



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	116/185

CENTRÍFUGA CLÍNICA

Así mismo en el análisis clínico de laboratorio se emplea la **Centrífuga clínica**, utilizada para la separación de sustancias de diferentes densidades por medio de una fuerza giratoria llamada fuerza centrífuga la cual imprime a la mezcla un movimiento de rotación que origina una fuerza, produciendo la sedimentación de los sólidos es decir los de mayor densidad por ejemplo la sangre.

Se emplea la velocidad centrífuga que aunada al peso de cada sustancia que se coloca dentro de ella, sirve para separar sus componentes dada la aceleración provista por un motor y medida en un vástago central en la parte superior de la centrífuga.

Para su utilización es necesario recordar que el peso de las suspensiones a centrifugar se incrementa hasta en 716 veces, por lo que es sumamente peligroso su manejo en forma inadecuada.

Por lo menos se deberá de recordar que para introducir las soluciones a centrifugar debe observar lo siguiente:

- Introducir las suspensiones en un tubo de ensayo que a su vez deberá de colocarse dentro de una camisa metálica, siempre será en pares y colocando dichas camisas en polos opuestos.
- Se deberán de tarar las camisas ya con los tubos dentro de ellas, utilizando una balanza granataria de dos platillos para que queden perfectamente equilibrados. Puede utilizar agua como equilibrante.
- Se deberá de colocar en el fondo una base de algodón o de hule para impedir la fractura de los tubos.
- Nunca abrir la tapa cuando esté en función el motor.**



Figura 15.4 Centrífuga clínica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	117/185

BALANZA ANALÍTICA

Finalmente para llevar a cabo los análisis clínicos es necesario cuantificar la cantidad de masa por lo que se requiere el uso de la balanza analítica.

Este equipo nos permite pesar cantidades mínimas de sustancias, que pueden ser de gramos, decigramos, centigramos, miligramos y diezmilésima de gramo. Constan de un sistema de amortiguadores que son sumamente sensibles, las más actuales ya son digitales y facilita el trabajo.

Dentro de los cuidados que debemos de tener para su manejo están:

- a) Mantenerla libre de polvo.
- b) Debe de estar colocada sobre una base que evitara la vibración.
- c) Se debe de verificar que esté nivelada antes de pesar.
- d) Se debe de evitar el error de paralaje al momento de nivelar y de la lectura del peso.
- e) No pesar sustancias corrosivas o volátiles



Figura 15.5 Balanza analítica



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	118/185

MATERIAL Y REACTIVOS

Material:

6 Tubos de ensayo 18X150

4 Tubos de ensayo de 13X100

Pisetas

1 Pipeta de 5 ml

Celdas para espectrofotómetro

Reactivos:

- Carbonato de calcio (CaCO_3)
- Solución de Azul de metileno de concentración 10mg/ml
- Solución buffer para calibrar potenciómetro (pH 7, pH10)
- Solución problema (saliva)

EQUIPO

Balanza granataria de dos platillos

Centrífuga clínica

Espectrofotómetro

Potenciómetro

SERVICIOS

Luz y agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	119/185

PROCEDIMIENTO

ESPECTROFOTÓMETRO

Construir una curva de calibración, mediante la utilización del espectrofotómetro de la siguiente manera:

- ▮ Seleccionar la longitud de onda a 450 nm. Calibrar el espectrofotómetro, colocando en la celda el tubo 1 (blanco) a 100 % de transmitancia y 0 % de absorbancia.
- ▮ Pipetear en cada tubo de ensayo lo siguiente:

Tubo N°	agua (ml)	azul de metileno (ml)
1	5.0	---
2	4.5	0.5
3	4.0	1.0
4	3.5	1.5
5	3.0	2.0
6	2.5	2.5

- ▮ Realizar la lectura de la absorbancia de cada uno de los tubos vaciando el contenido de cada uno de ellos en orden creciente en la celda del espectrofotómetro.
- ▮ Anotar los resultados y construir la gráfica en un sistema cartesiano (ver ANEXO 3)

POTENCIÓMETRO

- ▮ Calibrar el potenciómetro bajo la asesoría del profesor.
- ▮ Medir el pH de saliva ó de una solución problema.
- ▮ Anotar los resultados.

CENTRÍFUGA CLÍNICA

- ▮ Hacer una suspensión con los 10mg de carbonato de calcio pesados en la balanza analítica más 10ml de agua.
- ▮ Adicionar dicha suspensión en 4 tubos 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 ml respectivamente.
- ▮ Tarar los tubos para preparar e introducir a la centrifuga.
- ▮ Centrifugar a 2000 revoluciones por minuto (RPM), durante 3 minutos.
- ▮ Apagar la centrifuga, sacar los tubos y observar el resultado.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	120/185

RESULTADOS

Anotar cada uno de los resultados obtenidos en el desarrollo de la práctica y discutirlos con sus compañeros de equipo y profesor.

CUESTIONARIO

1. ¿A qué se refiere la Ley de Lambert y Beer?
2. ¿A qué se llama curva de calibración ó patrón?
3. ¿Cómo se hace una solución patrón?
4. Escriba dos ejemplos de condiciones que modifican el pH del cuerpo humano.
5. ¿Cuáles son los diferentes pH de: saliva, bilis, sangre arterial, sangre venosa, jugo gástrico?

BIBLIOGRAFÍA

- Bhagavan N. Bioquímica. 2º ed. México. Editorial Interamericana; 1978.
- Lehninger A. Bioquímica. 2ª ed. Barcelona. Ediciones Omega; 1979.
- Oppenheim I. Manual para técnicos de laboratorio. México. Editorial Panamericana; 1973.
- Plummer D. Bioquímica práctica. Latinoamérica. Editorial McGraw-Hill; 1981.
- Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 7º ed. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1989.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	121/185

PRÁCTICA 16

CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE LA SALIVA

OBJETIVO

Identificar la capacidad amortiguadora de la saliva y analizar el papel que juega en la producción de caries.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las soluciones amortiguadoras (buffer) en los organismos se distribuyen en diversos compartimentos. En el extracelular se concentran la mayoría, dado que debe mantener el pH estable, lo que facilitará el equilibrio del pH, intracelular. Dicho equilibrio se denomina HOMEOSTASIS, para mantenerla, el organismo utiliza soluciones de carbonatos, fosfatos y proteínas, en lo que se refiere a la sangre, saliva, sudor y otras secreciones.

En esta práctica se estudia la capacidad amortiguadora en saliva debido a su relación con el ámbito profesional.

Se debe recordar además que las soluciones amortiguadoras citadas existen en los sistemas pulmonar y renal siendo este último de mayor importancia.

De acuerdo a la teoría de la caries de mayor difusión y aceptación, los alimentos ricos en sacarosa, favorecen la producción de la enfermedad dentocariosa, así como también, la mala higiene y/o técnicas de aseo bucal defectuosas, que no eliminan adecuadamente la fuente alimenticia de las bacterias cariogénicas.

La saliva es el primer mecanismo inespecífico de defensa de la cavidad bucal, además posee un sistema de regulación para evitar los cambios bruscos de pH. Éste sistema es más evidente en los procesos de masticación, que cuando no existe estimulación, sea olfatoria, visual o gustativa.

La saliva estimulada por sus componentes es un sistema amortiguador muy efectivo, dicho sistema de protección, puede alterarse cuando se afecta el estado de hidratación del individuo (falta de consumo de agua, diarrea, fiebre, entre otros), o bien cuando se está realizando algún estudio y las condiciones de recolección y manutención salival no son las adecuadas.

Diversos estudios reportan que los individuos con mayor capacidad amortiguadora en saliva, son menos propensos a la caries.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	122/185

Las características fisicoquímicas de la saliva basal y estimulada son diferentes de acuerdo a su composición bioquímica, por ejemplo, la saliva basal contiene mayor cantidad de carbohidratos que la saliva estimulada, en tanto ésta última presenta abundantes proteínas y mayor cantidad de agua.

La saliva basal se produce principalmente en las glándulas submandibulares y sublinguales, en tanto que la estimulada en las parótidas.

El flujo salival es mayor durante la fase de estimulación cerebral, al igual que algunos de sus componentes.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

- Define pH
- Importancia del pH en el proceso carioso
- En que pH se desarrollan las bacterias cariogénicas

MATERIAL

- 1 Probeta de 50 ml
- 2 Vasos de precipitado de 50 ml
- 1 Bureta de 50 ml
- 1 Soporte universal con pinzas
- 1 Tira de parafina o un trozo de cera toda estación
- 1 Agitador de vidrio

REACTIVOS

1. Ácido clorhídrico 0.05N
2. Solución buffer pH 7 o disponible

EQUIPO

Potenciómetro



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	123/185

SERVICIOS

Luz y agua

PROCEDIMIENTO

- Al inicio de la práctica un (a) alumno (a), de cada equipo coleccionará saliva en un vaso de precipitado de 50 ml durante **15 minutos**.
- En una bureta, **medirá exactamente** la cantidad producida y anotará el volumen total, vertiéndola nuevamente en el vaso de precipitado. (saliva basal)
- **El mismo donador** de saliva, repetirá la recolección, pero masticando ahora un trozo de cera o una tira de parafina. Durante 15 minutos, midiendo y registrando el volumen recolectado. (saliva estimulada)
- Primero, el profesor ajustará y calibrará el potenciómetro
- Medirá el pH inicial de cada una de las salivas
- Realizará una titulación de volúmenes equivalentes con cada una de las salivas recolectadas.
- Para la titulación, los alumnos adicionarán 1 ml de ácido clorhídrico 0.05N a la saliva basal recolectada, agitándola con agitador de vidrio.
- Medir el pH resultante previo enjuague del electrodo con agua destilada; repetirán este paso hasta llegar a un pH de 3.0.
- Al llegar al pH de 3.0 anotarán el volumen total del ácido utilizado.

Pipetear **la misma cantidad** de saliva estimulada que de saliva basal recolectada; por ejemplo: si de saliva basal se obtuvo 7 ml y de saliva estimulada 25 ml solo pipeteara 7 ml.

Repetirán el procedimiento a partir de la adición del ácido clorhídrico, previo enjuague del electrodo con agua destilada.

Nuevamente anotarán el volumen de ácido clorhídrico utilizado para llegar al pH de 3.0.

- Levantarán el IHOS y CPO de los alumnos donadores de saliva, participantes en el grupo anotarán los resultados, y compararán los resultados de la capacidad amortiguadora y su relación con el proceso carioso.
- Calcular el volumen de saliva producido por minuto, por hora y por día de cada una de las muestras de saliva obtenidas para la práctica.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	124/185

RESULTADOS

Anotar los resultados en un cuadro comparativo entre saliva basal y estimulada de todo el grupo, resaltando los resultados de CPO e IHOS.

Equipo	pH inicial	Ácido clorhídrico (ml)	pH final	CPO	IHOS
1	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				
2	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				
3	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				
4	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				
5	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				
6	Saliva basal (ml)				
	Saliva estimulada (ml)				

Analizar y concluir que paciente es más susceptible a caries, respecto la capacidad amortiguadora de su saliva

Comparar el resultado del volumen de saliva obtenido por día con el reportado en la literatura y efectuar un análisis, relacionándolo con el proceso de caries.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es una solución amortiguadora?
2. ¿Cuáles son los rangos del pH “normal” de la saliva basal y estimulada?
3. ¿Qué componentes de la saliva son los que producen el efecto amortiguador?
4. Escribe otros ejemplos de sistemas amortiguadores en el organismo.
5. Escribe otras condiciones que alteren el pH del organismo además de las citadas.
6. ¿Cuál es la relación directa de caries y capacidad amortiguadora de la saliva



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	125/185

BIBLIOGRAFÍA

- Jenkins G. Fisiología y Bioquímica Bucal. México. Editorial Limusa; 1983.
- Lehninger A. Bioquímica. 2ª ed. Barcelona. Ediciones Omega; 1979.
- Bloom & Fawcett. Tratado de Histología. 11ª ed. México. Editorial Interamericana McGraw-Hill; 1998.
- Williams E. Bioquímica dental básica y aplicada. 2ª ed. México. Editorial Manual Moderno; 1990.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	126/185

PRACTICA 17

RETENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA BOCA

OBJETIVO

Comprobar la retención de azúcares reductores en la cavidad bucal mediante la utilización del reactivo de Benedict y relacionarlo con la salud bucal del paciente y el proceso carioso.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Que entiende por azúcares reductores

Qué importancia tienen los azúcares reductores en el proceso carioso

Como es el metabolismo de los azúcares reductores

FUNDAMENTO TEÓRICO

La retención de azúcares en la cavidad bucal, es sin duda alguna un factor de riesgo para caries dental, ya que provee a los microorganismos el sustrato idóneo para la síntesis de ácidos que desmineralizan los tejidos dentales. En esta práctica, se pondrá de manifiesto la retención de azúcares en cavidad bucal, por medio de la utilización de la solución alcalina de Benedict.

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos y, en personas que padecen diabetes, aumenta sustancialmente.

El impacto de los azúcares reductores en el humano al glucosilar a las proteínas, puede ser nocivo a la salud.

Se llaman azúcares reductores a todos aquellos que presentan grupos aldehídos o cetónicos libres y pueden ser determinados por medio de la utilización de iones cúpricos en soluciones alcalinas.

Al hacer reaccionar con el hidróxido de cobre son oxidadas hasta ácidos, manteniéndose el mismo número de átomos de carbono en la molécula (reacción 1). Mientras que las cetosas quedan divididas en ácidos con cadenas de carbono más cortas (reacción 2).



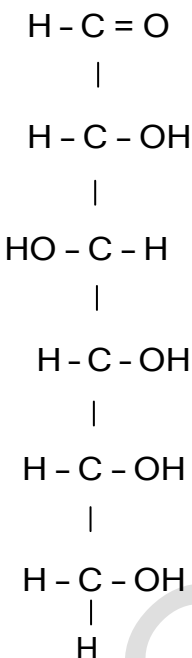
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	127/185

El aumento del número de grupos reductores presentes en el azúcar, aumentan la velocidad y el grado de oxidación.

De hecho la intolerancia a la lactosa corresponde a un problema de elevación de azúcares reductores, generando diversas molestias intestinales, como diarrea y meteorismo.

ALDOSA

D - GLUCOSA

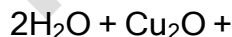


(2+)



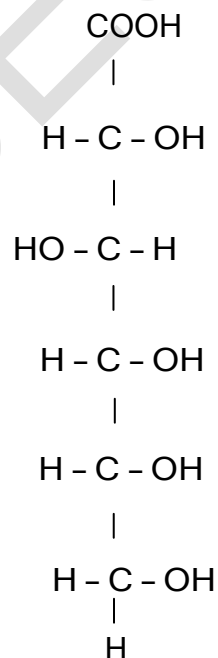
medio

alcalino



color
rojo

ÁCIDO GLUCÓNICO



(1+)

Reacción 1

La presencia de carbohidratos entre ellas glucosa en cavidad bucal, favorece el metabolismo microbiano, ya que nos sirve como sustrato para su alimentación y para la producción de compuestos de gran importancia que pueden tener relación con enfermedades bucales.

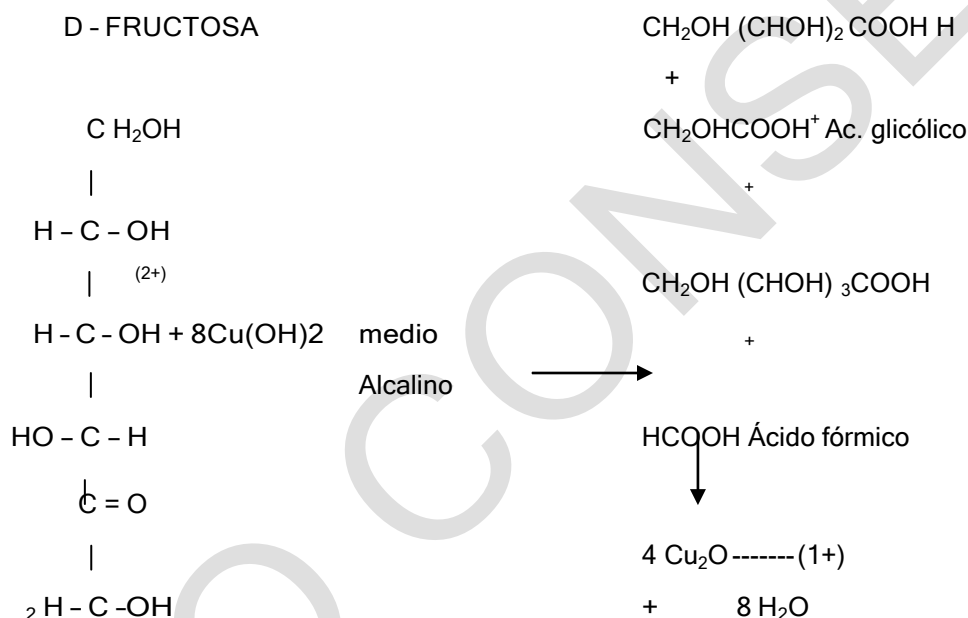


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	128/185

Este grupo aldehído es oxidado fácilmente a ácido carboxílico en pH neutro por enzimas y agentes oxidantes moderados. Esta propiedad se utiliza para detectar y cuantificar monosacáridos, especialmente la glucosa en fluidos biológicos como la sangre, la orina y en este caso identificarse en saliva.

El ácido monocarboxílico que se forma, se conoce como un ácido aldehído (p.e el ácido glucémico de la sangre).

CETOSAS Reacción 2



Estas reacciones son importantes como una prueba cualitativa muy útil para establecer la presencia o ausencia de azúcares reductores mediante la estandarización cuidadosa de la técnica.

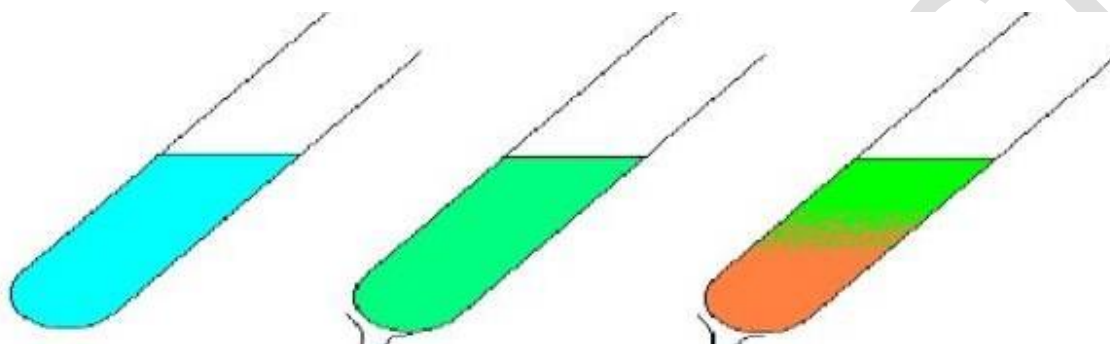


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	129/185

La prueba de Benedict es una reacciones de oxidación, que nos ayuda al reconocimiento de azúcares reductores, es decir, aquellos compuestos que presentan su OH anomérico libre, como por ejemplo la glucosa, lactosa o maltosa o celobiosa, en la reacción de Benedict, se puede reducir el Cu^{2+} que presenta un color azul, en un medio alcalino, el ión cúprico (otorgado por el sulfato cúprico) es capaz de reducirse por efecto del grupo aldehído del azúcar (CHO) a su forma de Cu^+ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso (Cu_2O), que precipita de la solución alcalina con un color rojo-naranja, a este precipitado se lo considera como la evidencia de que existe un azúcar reductor.



MATERIAL Y REACTIVOS:

Material:

- 8 Tubos de ensaye 18 X 150
- 1 Vaso de precipitado de 50ml
- 1 Pipeta de 10 ml
- Masking tape

Reactivos:

1. Solución de azúcar (glucosa, fructosa o galactosa).
2. Solución cualitativa de Benedict



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	130/185

EQUIPO

Baño maría o (Plancha de calentamiento y bazo de precipitado de 1000ml)

Vortex

SERVICIOS

Agua, luz.

PROCEDIMIENTO

Etiquetar por lo menos 5 tubos de ensaye con masking tape en la porción más superior de cada uno, colocando el equipo y el número de tubo. Una vez etiquetados, se le adicionarán 5 ml de Solución de Benedict.

Un alumno integrante del equipo procederá a enjuagarse la boca con 10ml. de solución de azúcar durante un lapso de 20 segundos y el momento en que la solución sea expulsada de la boca, se tomará como tiempo 0 (cero).

De manera inmediata, se colocará una muestra de saliva directa de la boca en el primer tubo, se agita en el Vortex, posterior a esto se calienta a durante 5 minutos a baño María.

A intervalos sucesivos de tres minutos, el mismo donador coleccionará saliva directa de la boca, colocándola en los siguientes tubos, que de igual forma, deberán ser agitados con el Vortex y calentados durante 5 minutos en baño María.

Una vez transcurridos los 5 minutos, se retiran del baño María y se observan.

La presencia de azúcar se determina por el cambio de color, que puede adquirir desde un tono rojizo, naranja, amarillo y verde, dependiendo de la cantidad de azúcares presente en el momento de la reacción.

La prueba se detiene cuando habiendo transcurrido los 5 minutos en baño María, no exista cambio de color, quedando en el mismo tono azul del reactivo de Benedict.

Nota: Durante el experimento no deberá tomarse agua.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	131/185

RESULTADOS

El tiempo final se establece cuando no haya cambio de coloración en la relación. Registre el tiempo requerido para la desaparición de azúcares de la saliva.

Es necesario levantar los índices CPOD e IHOS del donador de la muestra de saliva para relacionar los resultados de la práctica con la posibilidad de tener un factor de riesgo para caries dental.

CUESTIONARIO

Resolver el siguiente cuestionario

- 1.- Escriba tres alimentos que contengan azúcares reductores.
- 2.- Mencione si los disacáridos pueden ser azúcares reductores y ¿por qué?
- 3.- Explique cómo influyen las técnicas de cepillado dental y enjuagues bucales en la retención de azúcares reductores de cavidad bucal.
- 4.- Escriba qué importancia tiene con relación al proceso carioso la presencia de azúcares en cavidad bucal.
- 5.-Cuál es la relación de los azúcares reductores con la reacción de Maillard

BIBLIOGRAFÍA

- Conn, Stumpf; Bioquímica Fundamental 4ª edición. Editorial Limusa México, 2000.
- Bohinski, R. C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano, 1981.
- https://www.ecured.cu/Az%C3%BAcares_reductores
- Ávila Núñez, R, Rivas Pérez, B, Hernández Motzezak, R, Chirinos, M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. Multiciencias [Internet]. 2012;12(2):129-135. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002>
- Manuel Gómez-Gómez,* Cecilia Danglot-Banck,* Leopoldo Vega-Franco**. Intolerancia transitoria a lactosa: criterios y procedimientos de diagnóstico. Vol. 74, Núm. 1 • Ene.-Feb. 2007 pp 24-31. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2007/sp071g.pdf>



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	132/185

PRÁCTICA 18

IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS CONSTITUYENTES DE LA COLÁGENA

OBJETIVO

Identificar algunos aminoácidos que constituyen a la colágena, destacando las funciones que esta cumple en cavidad bucal.

CONCEPTOS PREVIOS

Para llevar a cabo la práctica satisfactoriamente el alumno deberá tener conocimientos básicos sobre: Aminoácidos, proteínas y sus estructuras. Métodos de separación de proteínas

FUNDAMENTO TEÓRICO

La colágena es una proteína compleja de tipo fibroso, en su composición de aminoácidos, el principal de ellos es la glicina, ya que se encuentra en cada tercer aminoácido. Además, posee dos aminoácidos que no se encuentran en otras proteínas; hidroxiprolina e hidroxilisina, la composición de la colágena varía de acuerdo al tipo y función de la misma.

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas, se unen mediante enlaces peptídicos, además, se pueden observar a otros aminoácidos no constituyentes de proteínas. Las proteínas son biomoléculas, con diversas funciones, que van desde la conformación de las membranas celulares a la enzimática, la función biológica dependerá de su estructura.

La colágena es una proteína que está constituida en su tercera parte por glicina y se encuentra distribuida en todo el tejido conectivo del organismo. Se han llegado a identificar y describir más de 20 tipos diferentes siendo los tipos I, II, III, IV y V los más conocidos.

La colágena es un componente principal de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos su estructura básica está dada en grupos repetidos de tres aminoácidos (Glicina-X-Y). En donde X y Y con mayor frecuencia es prolina, hidroxiprolina, y en menor frecuencia lisina e hidroxilisina. Existen 19 tipos de colágena con características estructurales basadas en su composición molecular y presentes en diversos tejidos. La colágena Tipo I, V y XII se encuentra en el ligamento parodontal y cámara pulpar; en la dentina se localiza la colágena tipo I.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	133/185

Por otra parte, la colágena es un reservorio de cationes, aniones y pequeñas moléculas. Se ha utilizado como un andamio en ingeniería de tejidos, debido a que el entrecruzamiento y superposición de sus fibras da lugar a espacios denominados zonas hole, los cuales permiten el depósito, crecimiento y maduración de precursores minerales en la formación de tejidos mineralizados.

Al hidrolizar a la colágena se obtienen sus aminoácidos, mismos que identificaremos mediante la utilización de un método de separación selectiva por medio de sus pesos específicos, dicho método consiste en la utilización de una placa con gelatina formada con sílice, en esta placa mediante adsorción los diferentes aminoácidos correrán hacia la parte superior, utilizando como vehículo una solución de ácido acético, butanol y agua; a este método se le conoce como cromatografía de capa fina. La cual tiene dos fases, una fija que se da en la parte sólida y una móvil que se realiza dentro de una cámara de cromatografía, en donde se impregna la placa con los solventes citados anteriormente, dichos solventes de acuerdo a la polaridad de los aminoácidos los transportarán y cada aminoácido se detendrá de acuerdo a su peso molecular.

A la distancia específica que recorre cada aminoácido u otro compuesto se le denomina **R_f**, este valor se calculará utilizando la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia del origen al centro de la mancha.(mm)}}{\text{Distancia del origen al frente de disolvente.(mm)}}$$

Existen otros tipos de cromatografía para la identificación de sustancias, de mayor y menor exactitud, complejidad y metodología.

Tales estudios en la clínica se emplean por ejemplo: para la detección de fármacos en sangre (antidoping), para separar solutos de líquidos, (separación de proteínas del suero), determinación de la pureza de sustancias o bien determinación de la composición de materiales.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	134/185

MATERIAL

1 Lámina para cromatografía (cromatograma) 10X8 cm.

1 Regla (deberá traerla el equipo).

6 vasos de precipitados de 50 mL. por grupo

6 capilares

Parafilm

REACTIVOS

Soluciones de aminoácidos

Solución problema

Solvente

Ninhidrina

EQUIPO

Cámara de cromatografía

Estufa

SERVICIOS

Luz y Agua

PROCEDIMIENTO

1. Con un lápiz, marcar a una distancia de 2 cm del borde de la placa, una línea, muy suavemente y sin tocarla con los dedos u otro material.
2. Dividir dicha línea en 6 puntos equidistantes.
3. Colocar 1 gota de cada muestra (aminoácidos de referencia o muestra problema), dejar secar la gota adicionada y aplicar otra gota, es necesario repetir este proceso hasta completar 3 gotas en cada punto. Es indispensable anotar en su libreta, el sitio en que se colocó cada muestra.
4. Una vez terminado el procedimiento anterior, introducir los cromatogramas (placas) en la cámara de impregnación que contiene la mezcla de solventes (agua, butanol y ácido acético). Para distinguir las placas, es necesario marcarlas en extremo superior derecho con el nombre del equipo.
5. Sellar la cámara y permitir la migración de los solventes, por lo menos hasta que cubran las 2/3 partes de la placa (1 hora).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	135/185

6. Transcurrido el tiempo y/o distancia, extraer la placa y marcar hasta donde haya llegado el frente de la mezcla de solventes.
7. Secar la placa en estufa.
8. Colocar la placa en una cámara de extracción o en una zona bien ventilada. Posteriormente, rociar en toda la placa la Ninhidrina (este reactivo es muy tóxico).
9. Secar nuevamente la placa en la estufa. Aparecerán unas manchas, debe circularlas, marcar el centro de cada una, identificar el color y anotarlo. Además, medirá la distancia del centro de la mancha hasta el punto en donde colocó inicialmente los aminoácidos y el problema, anotando el resultado en mm.
10. Calcular el **R_f** de cada mancha, anotando el nombre del aminoácido correspondiente, en el caso del problema puede aparecer más de una mancha, por lo que deberá de anotar los aminoácidos reconocidos mediante este método.

RESULTADOS

Anotar los resultados obtenidos en el cromatograma, especificando los aminoácidos contenidos en la solución problema.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las funciones de la colágena en el organismo?
2. ¿Cuáles otros tipos de cromatografía existen?
3. ¿En qué sitios de la cavidad bucal existe colágena?
4. Escribe 3 ejemplos más de los tipos de colágena y su localización.
5. ¿Cuáles son las funciones de la colágena en los tejidos dentarios?
6. ¿Cuál es la diferencia entre hidrólisis y desnaturalización?
7. Mencione las consecuencias clínicas en cavidad oral de un error en la síntesis de colágena.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	136/185

BIBLIOGRAFÍA

- Bhagavan N. Bioquímica. 2º ed. México. Editorial Interamericana; 1978.
- Martín D. Mayes P. Bioquímica de Harper. 15ª ed. México. Editorial El Manual Moderno; 2002.
- Fawcett B. Tratado de Histología. 12º ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill; 1995.
- Lesson P. Texto y Atlas de Histología. México. Editorial Interamericana. McGraw-Hill; 1990.
- Pecsok R. Shields, L. Métodos Modernos de Análisis Químicos. México. Editorial Limusa; 1977
- López Jordi MC, Amaral Schiaffino R, Bussadori Kalil S. Enzymatic proteolysis of dentin collagen. Odontoestomatología. 2010; 12(14): 35-44.
- Almaguer Flores A, Villagómez Olea JG. Ecología oral. México. Editorial El Manual Moderno; 2018.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	137/185

PRÁCTICA 19

ACTIVIDAD DE LA AMILASA SALIVAL

OBJETIVO

Identificar la actividad enzimática de la amilasa salival sometiéndola a diferentes pH para analizar su importancia en el proceso digestivo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Concepto de enzima,

Factores que modifican la actividad enzimática

FUNDAMENTO TEÓRICO

La saliva es un fluido biológico de gran importancia, ya que, además de mantener la homeostasis en la cavidad oral, es un medio perfecto para monitorear la salud en general, es secretada por las glándulas salivales menores y mayores debido a que está compuesta de una variedad de proteínas, enzimas, hormonas, anticuerpos, constituyentes antimicrobianos y citocinas, muchos de los cuales pasan de la sangre a la saliva, a través de sistemas de transporte intra y extracelular.

Dentro del contenido proteico de la saliva, el componente de mayor concentración es la α -amilasa, secretada por las glándulas salivales además de otra amilasa secretada en el páncreas y, ambas de carácter enzimático. La variabilidad en la concentración o actividad de la α -amilasa salival o la pancreática permite detectar anomalías en los órganos que la producen.

La α -amilasa encontrada en la saliva humana (AASH) es la suma de la secretada por las glándulas salivales y de la secretada por el páncreas la cual, por mecanismos de transporte celular, entra a formar parte de la saliva. Para fines didácticos de la práctica se considerará la amilasa producida por las glándulas salivales

La AASH tiene múltiples funciones biológicas: como enzima cumple un papel importante en la digestión inicial de almidón, el glucógeno y otros polisacáridos, porque cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos, lo cual resulta en la configuración α -anómerica de los oligosacáridos. Al ser la proteína de mayor abundancia en la saliva, hace parte de la película adquirida y de la placa dentobacteriana; adicionalmente, se une con alta afinidad a un selecto grupo de estreptococos orales.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	138/185

Se ha encontrado que su concentración se eleva, lo cual refleja un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático, por lo cual se ha propuesto como un biomarcador sensible a cambios en el organismo humano que están relacionados con el dolor y estrés.

La actividad enzimática se modifica por las variaciones de temperatura, concentraciones de sustrato y modificaciones en el pH, en el caso de la cavidad bucal, estos factores se hacen evidentes con los cambios de dieta (**se modifica el pH**), con el tipo de respiración (el respirador bucal modifica la temperatura oral), o bien una deficiente técnica de cepillado (**incremento del sustrato**), por lo que será necesario evidenciar como afecta a la actividad enzimática la modificación de alguno de estos factores.

La enzima α -amilasa salival humana (ASH), es una de las enzimas clave de tipo hidrolasa y la más abundante en la saliva humana. Inicia la digestión de carbohidratos complejos en la cavidad bucal, es responsable de romper los enlaces glucosídicos en el almidón tales como, la amilosa y amelopectina (eritrodextrina y acrodextrina), hasta llegar a **maltosa**.

Para determinar la degradación del almidón en laboratorio, es necesario hacer evidente dicha hidrólisis, por lo que se realizará una reacción colorida utilizando lugol, ya que el almidón al reaccionar con el yodo produce un color morado ó azul oscuro.

La hidrólisis que realiza la amilasa salival, se verá afectada por las diversas soluciones de pH (soluciones buffer). De acuerdo con la teoría, las proteínas se desnaturalizan o hidrolizan cuando son sometidas a cambios de pH, por lo que la velocidad de acción es diferente para cada pH utilizado.

A la velocidad de función de cada enzima se conoce como **índice de actividad enzimática (IAE)**, dicha velocidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IAE} = 1/t \times 100$$

Donde **t** es el tiempo correspondiente que tarda la amilasa en degradar totalmente el almidón hasta la maltosa, y en la práctica se demuestra llegando al **punto acrómico**, este punto se reconoce cuando al adicionar la solución de almidón +buffer + saliva diluida, ya no hay cambio de color con el lugol.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	139/185

Ejemplo



Imagen 1: Cortesía C.D.E Virginia Rocha

Se convierten los 3 min a segundos

(3 x 60seg = 180seg)

A 180 seg se suman los 30 seg
restantes del tiempo transcurrido

Hora de inicio de reacción (al
agregar lugol): tiempo 0

Se adicionó cada x tiempo

Tiempo transcurrido de inicio
de reacción a punto
acrómico: 3min, 30 segundos

$$IAE = \frac{1}{210 \text{ seg}} * 100$$

Se divide 1 entre los segundos totales
(210)=0.0047 y este resultado se
multiplica por 100 dando como resultado
IAE en pH 5= 0.47 seg

MATERIAL

3 Placas de porcelana

9 tubos de ensaye 20 x 150

1 gradilla

3 pipetas Pasteur

1 pipeta de 10 mL por equipo

1 pipeta de 1 mL por equipo

8 matraces de 100 mL por grupo

8 pipetas de 5 mL por grupo



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	140/185

REACTIVOS

Solución de almidón al 0.9%

Reactivo de lugol

Soluciones buffer de pH 3, 5, 6,6.5, 7, 8, y 10

Muestra de saliva diluida 1:10

SERVICIOS

Luz y Agua

PROCEDIMIENTO

1. Un integrante de cada equipo adicionará 1 ml de saliva en 1 tubo de ensaye cada uno, el primero debe diluir su saliva adicionando 9 ml más de agua destilada, etiquetando el tubo (1:10) y mantendrá su temperatura aproximadamente en 37° C, en su mano.
2. Mientras, otro integrante etiquetará los tubos de ensaye con los pH correspondientes de 3, 5, 6, 6.5, 7, 8 y 10 y a los que adicionará 3.0 ml de cada solución buffer.
3. A cada tubo de solución buffer se le adicionan 2 ml de solución de almidón al 0.9%.
4. Se deben mantener los tubos a la temperatura de 37° C aproximadamente, sea en baño maría o calor corporal.
5. Preparar una placa de porcelana para cada saliva, adicionando 2 gotas de reactivo lugol.
6. Adicionar 1 ml de la saliva diluida a la solución buffer a medir, inmediatamente se mezcla con la pipeta Pasteur y se adicionan 2 gotas en una de las cavidades de la placa de porcelana, tomándose como tiempo inicial (0), se adicionará con intervalos de 30" a cada cavidad de la placa en orden secuencial, hasta llegar al punto acrómico, anotando el tiempo total para cada solución.

***Los pH de 5, 6, 6.5 y 7 se realizarán cada 30" pH 5 y 8 cada minuto y los de 3, y 10 Cada 3 minutos.**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	141/185

RESULTADOS

El color azul, indica la presencia de almidón y la actividad de la enzima, se observa con los cambios de coloración que se dan a lo largo del tiempo, al agregar en cada intervalo, la muestra de saliva hasta llegar al punto acrómico (color amarillo del lugol).

Calcular el IAE de acuerdo a la fórmula y graficar en ejes cartesianos, (ver ANEXO 3) anotando el pH óptimo para cada saliva medida y haciendo un cuadro comparativo de todo el grupo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	142/185

BIBLIOGRAFÍA

1. Tananska VT. (2014). Salivary α -Amylase and chromogranin A in anxiety-related research. Folia Med Plovdiv 2015
2. Chennaoui M, Bougard C, Drogou C, Langrume C, Miller C, Gomez-Merino D, Vergnoux F. (2016). Stress biomarkers, mood states, and sleep during a major competition: success and failure athlete's profile of high-level swimmers. Front Physiol 2016
3. Yi TC, Mochhala S. Current Opinion on Salivary Biomarkers as a Measurement for Stress and Fatigue. Open Biomarkers J 2013
4. Woltgens JH, Etty EJ, Gruythuysen RJ, Geraets WG. Influence of fluoride in saliva during the early cariogenic changes in the enamel of boys and girls. ASDC J Dent Child 1995.
5. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 7º ed. México, 1989.
6. Jenkins, G.N Fisiología y Bioquímica Bucal, 1ª edición, Editorial Limusa, México. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1983.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	143/185

PRACTICA 20

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PROTEÍNAS EN DIENTE

OBJETIVO

Analizar los componentes orgánicos de diente a través del método de Folin-Ciocalteu para comprobar la presencia de proteínas.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Sistema de unidades, conversiones y sistema cartesiano

Porcentaje de componentes orgánicos en cada estructura dentaria

Porcentaje de componentes inorgánicos en cada estructura dentaria

Porcentaje de proteínas en esmalte y dentina

Tipo de proteínas presentes en cada estructura dentaria y su función

FUNDAMENTO TEÓRICO

El órgano dentario tiene estructuras constituidas por material orgánico e inorgánico, en diversas proporciones y cada uno de estos varía dependiendo de la estructura, por ejemplo: el esmalte contiene un 99% de material inorgánico y 1% de material orgánico, en tanto que la dentina y el cemento, poseen del 70 al 80% de material inorgánico y 20 al 30 % de material orgánico y la pulpa posee un predominio de material orgánico.

La función de la materia orgánica es básica, ya que es el molde estructural para la formación del diente, es necesario entonces conocer su composición, su función y cómo participa en la formación del órgano dentario.

La composición de los órganos dentarios en cada individuo varía por diversos factores tales como: sus características genéticas, nutricionales, edad, y raza, entre otros, incluso cada órgano dentario presenta variaciones de uno a otro, por ejemplo: canino, molar, incisivo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	144/185

Además dentro de los componentes orgánicos, se citan variaciones importantes de acuerdo a la edad del paciente, es mayor su contenido en los más jóvenes (diente en desarrollo) que en los adultos (diente maduro).

En el esmalte dentario, el porcentaje de proteínas es mínimo pero entre ellas se encuentra la amelogenina, parvabúmina, enamulina, ameloblastina y tuftelina.

Por otro lado, las proteínas de la dentina se encuentran en mayor proporción entre las que se destaca la presencia de colágeno tipo I, sialoproteínas, proteína GLA, glicoproteínas y proteoglucanos.

El promedio porcentual de proteína en diente también varía si es un órgano cariado o no. En el caso de los dientes sanos se han reportado las siguientes cantidades de proteínas.

- Esmalte_____ 0.2%
- Dentina_____ 20.0%
- Cemento_____ 22.0%

El factor anterior puede modificar los resultados de la práctica, ya que los dientes que se han molido para preparar son cariados o sanos y son diferentes (incisivos, caninos, premolares o molares).

En la presente práctica, se podrá de manifiesto la presencia de proteínas en el diente por la técnica de Lowry con el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC). La reacción de las proteínas con el RFC ocurre en dos etapas: 1) Reacción con cobre en medio alcalino y 2) Reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por la proteína tratada con cobre.

Este método es más sensible a la cuantificación que la reacción con ninhidrina o que la reacción de Biuret.

MATERIAL y REACTIVOS

Material:

- 8 Tubos de ensayo de 18 x 150
- 1 Gradilla
- 1 Pipeta de 10 ml
- 2 Pipetas de 5ml
- 4 Pipetas de 1 ml



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	145/185

- 1 Piseta con agua destilada
- Papel milimétrico
- Calculadora

Reactivos:

- Solución alcalina (Na_2CO_3 al 4%, CuSO_4 al 2%, tartrato de NaK al 4%)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) diluido 1:2
- Estándar de proteína de huevo de [1mg/ml]
- Hidróxido de sodio 1.5N
- Solución "O" por grupo (preparada de 7 a 15 días previos a la práctica con 4.5 - 5g de diente molido pesado en la balanza analítica + 25ml de HCl al 6N en un matraz volumétrico de 100ml)

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex

SERVICIOS

- Agua
- Luz

PROCEDIMIENTO

1. Aforar la solución "O" preparada con anterioridad a 100ml.
2. De esta solución pipetear 5.0ml y transferir a un matraz aforado de 100ml, adicionar 5.0ml de Hidróxido de sodio 1.5N, homogeneizar esta solución y anotar las características físicas, aforar esta solución y etiquetar como solución "C" (solución problema).



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	146/185

3. Preparar una serie de 7 tubos etiquetando del 1 al 7 de la siguiente manera:

Tubo	Agua destilada (ml)	Estándar de proteína(ml)	Solución "C" (problema) (ml)
1	1.0	--	--
2	0.9	0.1	--
3	0.8	0.2	--
4	0.7	0.3	--
5	0.6	0.4	--
6	0.5	0.5	--
7	0.5	--	0.5
8	--	--	1.0

4. Adicionar 5 ml de solución alcalina a cada tubo y mezclar. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Adicionar 0.5 ml de RFC y mezclar después de cada adición (**no adicionar RFC a más de un tubo**, sin mezclar inmediatamente, ya que se podría alterar el curso de la reacción).
6. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollo del color.
7. Calibrar el espectrofotómetro con el tubo 1 a 0% de absorbancia con una longitud de onda de 660 nm y proceder a leer todos los tubos. En caso de requerir la recalibración del espectrofotómetro se deberá utilizar nuevamente el tubo 1.

A partir de los resultados obtenidos se debe calcular los equivalentes de proteína en la muestra de diente y contrastarlos con el porcentaje referido en la bibliografía.

Para la realización de conversiones y cálculos puedes apoyarte en las tablas del sistema de unidades, sistema cartesiano y ejemplo de problema de componentes de diente que se encuentran como anexos de este manual.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	147/185

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "C"
3. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos problema (7 y 8)
4. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de proteínas en cada uno de los tubos problema (7 y 8).
5. Reportar la concentración en mg de proteína en la solución "C" así como el porcentaje.
6. Reportar la concentración en mg de proteína en la solución "O" así como el porcentaje.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es la función de las proteínas en el diente?
- 2.- ¿Cuáles son las proteínas que encontramos en diente y cuál de ellas se encuentra en mayor cantidad?
- 3.- ¿Cuáles son las concentraciones de proteínas citadas en diversas bibliografías?
- 4.- ¿En qué otras estructuras del Sistema Estomatognático se encuentran las proteínas?

BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R. C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano, 1978.
- Bhagaban, N.V.: Bioquímica 2ª edición, Editorial Interamericana, México, 1978.
- Burnett, G.W.: Scherp, H.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª editions. Ed. The Williams 7th Co., Baltimore U.S.A. 1976
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, 1ª edición, Editorial Limusa, México, 1983.
- Voet, D., Pratt, C.: Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular, 4ª edición. Ed. Médica Panamericana, México, 2016.
- Williams. Elliot: Bioquímica dental básica y aplicada, 2ª edición. Editorial Manual Moderno, México 1990



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	148/185

PRÁCTICA 21

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CARBOHIDRATOS EN DIENTE

OBJETIVO

Analizar los componentes orgánicos de diente a través de un método colorimétrico para comprobar la presencia de carbohidratos.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Porcentaje de carbohidratos en esmalte y dentina

Tipo de carbohidratos presentes en cada estructura dentaria y su función

FUNDAMENTO TEÓRICO

La función de los carbohidratos en el diente es la de constituir la matriz orgánica. Entre estos, se pueden encontrar hexosas simples como glucosa, manosa, galactosa, xilosa y fucosa; azúcares ácidos como ácido glucurónico y glucoproteínas.

En la dentina, el ácido hialurónico, sulfato 4 de condroitín y sulfato 6 de condroitín son los carbohidratos que se encuentran en mayor cantidad.

La presencia de carbohidratos en diente dependen de la composición de los órganos dentarios en cada individuo que varía por diversos factores tales como: sus características genéticas, nutricionales, edad, raza, sexo, e incluso el tipo de diente, esto debido a su anatomía y tamaño. La concentración de carbohidratos en las estructuras dentales es mucho menor que la de proteínas ya que se encuentra aproximadamente en 0.5% o incluso menos.

Además, dentro de los componentes orgánicos se citan variaciones importantes de acuerdo a la edad del paciente, ya que es mayor en los dientes jóvenes (en desarrollo) que en los adultos (diente maduro).

De acuerdo a la teoría de formación de caries de Miller, se produce una desmineralización ácida del diente, lo que nos indica que los microorganismos de



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	149/185

la biopelícula dental, pueden utilizar la materia orgánica como sustrato para la producción de ácidos, en especial los carbohidratos como la sacarosa, lo cual favorece la desmineralización del esmalte y su posterior cavitación.

En la presente práctica se realizará un método colorimétrico, el cual depende de la formación de color al utilizar fenol en ácido sulfúrico concentrado. Los carbohidratos al ser calentados con ácidos minerales sufren deshidratación para formar furfural en la pentosas e hidroxifurfural en la hexosas. Estos derivados furfural se condensan con los fenoles para dar un reactivo colorido estable y fácil de identificar por espectrofotometría.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material:

- 8 Tubos ensayo
- 1 Gradilla
- 2 Pipeta de 10 ml
- 1 Pipeta de 5 ml
- 3 Pipetas de 1 ml
- 1 Bureta de 50 ml
- 1 soporte universal con 2 pinzas para bureta
- 1 embudo de vidrio
- 1 Matraz erlenmeyer de 50 ml
- 1 Matraz aforado de 100 ml
- 1 Piseta con agua destilada
- 1 Disco de papel filtro

Reactivos:

- Solución de Fenol al 80%
- NaOH al 1.5N
- Estándar de glucosa [0.1mg/ml]
- H₂SO₄ concentrado
- Solución "O" (misma de la práctica anterior)



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	150/185

EQUIPO

- Vortex
- Espectrofotómetro con celdas de vidrio

SERVICIOS

- Agua
- Luz

PROCEDIMIENTO

1. Por grupo, pipetear 15ml de la solución "O" y transferir a un matraz Erlenmeyer de 50ml, adicionar 15ml de NaOH al 1.5N, homogeneizar esta solución y anotar las características físicas.
2. Con ayuda de un embudo y papel filtro, filtrar esta solución en un matraz aforado de 100ml y etiquetar como solución "C" (problema).
3. Etiquetar los tubos de ensaye del 1 al 8 y prepararlos de la siguiente manera:

Tubo	Agua destilada (ml)	Estándar de glucosa(ml)	Solución "C" (problema) (ml)
1	2.0	--	--
2	1.9	0.1	--
3	1.8	0.2	--
4	1.7	0.3	--
5	1.6	0.4	--
6	1.5	0.5	
7	1.5	--	0.5
8	1.0	--	1.0



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	151/185

- Posteriormente, adicione a cada tubo 0.1ml de fenol al 80%, mezclando inmediatamente en el vortex.
- Adicione por la pared de cada tubo 4ml de ácido sulfúrico concentrado contenido en una bureta y mezclar nuevamente con precaución en el vortex para la producción de color.
- Dejar reposar durante 20 a 30 minutos.
- Transcurrido el tiempo, calibrar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm utilizando el tubo 1 como blanco a 0% de absorbancia. Si es necesario, deberá recalibrarse el aparato para evitar errores de desviación. Continuar la lectura de la absorbancia de los tubos 2 al 8.

A partir de los resultados obtenidos se debe calcular los equivalentes de carbohidrato en la muestra de diente y contrastarlos con el porcentaje referido en la bibliografía.

Para la realización de conversiones y cálculos puedes apoyarte en las tablas del sistema de unidades, sistema cartesiano y ejemplo de problema de componentes de diente que se encuentran como anexos de este manual.

RESULTADOS

- Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
- Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "C"
- Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos problema 7 y 8
- Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de carbohidratos en cada uno de los tubos problema (7 y 8).
- Reportar la concentración en mg de carbohidratos en la solución "C" así como el porcentaje.
- Reportar la concentración en mg de carbohidratos en la solución "O" así como el porcentaje.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	152/185

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la función de los carbohidratos en el diente?
2. ¿Cuáles son los carbohidratos que se encuentran en diente y cuál es el más abundante?
3. ¿Cuáles son las concentraciones de carbohidratos en diente citadas en diversas bibliografías?
4. ¿En qué otras estructuras del sistema estomatognático se encuentran carbohidratos?

BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R.C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano. 1978
- Burnett, G.W.: Scherp, H.W.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª edición. Ed. The Williams & W. Co., Baltimore U.S.A. 1976.
- Díaz Zagoya, Hicks.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México, 1995.
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, Editorial Limusa, México, 1983.
- Voet, D., Pratt, C.: Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular, 4ª edición. Ed. Médica Panamericana, México, 2016.
- Williams Elliot.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada 2ª ed. Editorial El Manual Moderno, México, 1990.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	153/185

PRÁCTICA 22

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FÓSFORO EN DIENTE

OBJETIVO

Analizar los componentes inorgánicos de diente a través del método fotolorimétrico de molibdato para comprobar la presencia de fósforo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Porcentaje de fósforo en esmalte y dentina

Importancia del fósforo en la formación de la hidroxiapatita

FUNDAMENTO TEÓRICO

El fósforo es uno de los componentes inorgánicos del diente más abundante, ya que forma parte estructural de las apatitas junto con el calcio, es además, uno de los constituyentes orgánicos más importantes dada su participación en las reacciones para la producción de energía formando ATP.

El fósforo es un oligoelemento que participa en la contracción muscular, formando parte de los enlaces en las cadenas de ADN y ARN, así como también en la formación de enzimas de ciclos catabólicos indispensables como la glucólisis (fosfofructocinasa), además de la formación del AMP cíclico, que participa como segundo mensajero, en varios procesos bioquímicos.

La composición de los órganos dentarios, se distribuye en material orgánico e inorgánico, siendo comparativamente mayor el inorgánico, el depósito de sales minerales, depende directamente del fósforo, por lo que su carencia y/o disminución, modifica la estructura rígida de las estructuras dentales.

Además, participa como parte de los sistemas amortiguadores de la saliva y sangre en forma de fosfato.



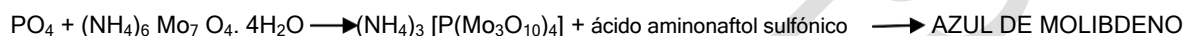
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	154/185

La concentración de fósforo varía en la porción orgánica del diente, como en la matriz amorfa, también se encuentra en diferente cantidad en forma de cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio. El promedio de fósforo presente en diente es de aproximadamente 13 a 17%.

En esta ocasión, se realizará la determinación del fósforo mediante la utilización de un reactivo de molibdato. El fósforo reacciona con el molibdato de amonio produciendo una sal de fosfomolibdato de amonio, la cual es sometida a una reacción de reducción utilizando el ácido amino naftol sulfónico, formando un complejo colorido denominado azul de molibdeno.



MATERIAL Y REACTIVOS

Material por equipo:

- 8 tubos de ensaye
- 1 gradilla
- 1 pipeta de 10ml
- 3 pipeta de 5 ml
- 3 pipeta de 1 ml
- 2 matraces aforados de 100ml
- 1 Piseta con agua destilada

Reactivos:

- Reactivo de molibdato
- Ácido amino naftol sulfónico
- Estándar de fósforo [10µg/ml]
- Solución "O" (misma utilizada en la práctica anterior)

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	155/185

SERVICIOS

- Agua
- Luz

PROCEDIMIENTO

1. Pipetear 10ml de la solución “O” y transferirlos a un matraz volumétrico de 100ml, aforar y etiquetar como solución “A”.
2. Tomar 1ml de la solución “A” y transferir a otro matraz volumétrico de 100ml, aforar y etiquetar como solución “B” (problema).
3. Etiquetar los tubos de ensaye del 1 al 8 y prepararlos de la siguiente manera:

Tubo	Estándar de P en ml	Solución problema (solución “B”) en ml	Agua destilada en ml
1	--	--	5.0
2	0.5	--	4.5
3	1.0	--	4.0
4	2.0	--	3.0
5	3.0	--	2.0
6	4.0	--	1.0
7	--	2.0	3.0
8	--	2.5	2.5

4. Adicionar a cada tubo 1.0ml del reactivo de molibdato y mezclar.
5. Agregar 0.4ml de ácido amino naftol sulfónico, mezclar inmediatamente y dejar reposar.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	156/185

6. Después de 5 minutos pero antes de 20 minutos, leer la absorbancia de los tubos en el espectrofotómetro a 66nm de longitud de onda, previamente calibrado con el tubo 1 a 0% de absorbancia.

A partir de los resultados obtenidos se debe calcular los equivalentes de fósforo en la muestra de diente y contrastarlos con el porcentaje referido en la bibliografía.

Para la realización de conversiones y cálculos puedes apoyarte en las tablas del sistema de unidades, sistema cartesiano y ejemplo de problema de componentes de diente que se encuentran como anexos de este manual.

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "B" (problema)
4. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos problema 7 y 8
5. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de fósforo en cada uno de los tubos problema (7 y 8).
6. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "B" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "A" así como el porcentaje.
8. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "O" así como el porcentaje.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es la función del fósforo en el organismo?
- 2.- ¿En qué tipo de reacciones del organismo se encuentra el fósforo?
- 3.- ¿Cuál es su importancia biológica?
- 4.- ¿Cuál es la participación del fósforo en las estructuras dentales?



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	157/185

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA Y/O BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R.C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano. 1978
- Bhagaban, N.V.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana, México, 1978.
- Burnett, G.W.: Scherp, H.W.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª edition. Ed. The Williams & W. Co., Baltimore U.S.A. 1976.
- Díaz Zagoya, Hicks.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México, 1995.
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, Editorial Limusa, México, 1983.
- Newbrun, Ernest.: Cariología, Editorial Limusa, México, 1984.
- Matheus, Van Holde.: Bioquímica, 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw Hill, España, 1998.
- Voet, D., Pratt, C.: Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular, 4ª edición. Ed. Médica Panamericana, México, 2016.
- Williams Elliot.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada 2ª ed. Editorial El Manual Moderno, México, 1990.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	158/185

PRÁCTICA 23

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CALCIO EN DIENTE, SALIVA Y ORINA

OBJETIVO

Analizar los componentes inorgánicos de diente, saliva y orina a través del método de O-cresoftaleína para comprobar la presencia de calcio.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Porcentaje de calcio en esmalte y dentina

Importancia del calcio en la formación de la hidroxiapatita

FUNDAMENTO TEÓRICO

El calcio es uno de los iones de mayor importancia dentro de las funciones orgánicas, es necesario en funciones de mineralización, coagulación, transporte, mantener la estabilidad y selectividad de la membrana celular.

En el caso de la mineralización dental, es importante ya que el momento en el que se forman los complejos de fosfatos, se induce la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico (apatitas).

El calcio, está presente fundamentalmente en la leche y derivados como el queso, yema de huevo, aguas duras y vegetales; en menor proporción en lentejas, frijoles, nueces, higos, coliflor y espárragos. Además en el caso de los alimentos marinos, estos contienen mucho calcio, en especial en aquellos alimentos desecados.

El calcio es el mineral más abundante en el organismo, se distribuye ampliamente en las estructuras óseas y en los dientes, en los recién nacidos y lactantes, se encuentra en forma de fosfato de calcio amorfo y con el crecimiento se transforma en fosfato de calcio cristalino (hidroxiapatita).

El calcio forma con la orto-cresoftaleína en solución alcalina, un complejo colorido. El método no necesita desproteinización, pues el pH alcalino de la solución



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	159/185

amortiguadora, solubiliza las proteínas plasmáticas y permite la liberación del calcio ligado a las proteínas.

La formación del complejo colorido es inmediata y no necesita ningún tiempo de espera para efectuar la lectura colorimétrica.

La presencia de 8-hidroxiquinoleína elimina la interferencia del magnesio hasta concentraciones de 10 mg/dl. La inclusión de cianuro de potasio en la solución amortiguadora, elimina la interferencia de metales pesados.



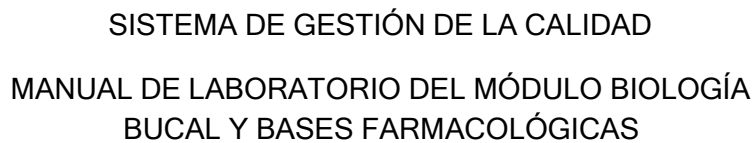
MATERIAL Y REACTIVOS

Material por equipo:

- 10 Tubos de ensayo de 13 x 100mm
- 1 Gradilla
- 5 Pipeta de 10 ml
- 1 Pipeta de 1 ml
- 6 Pipetas de .2 ml
- 2 Matraces aforados de 100 ml
- 1 vaso de precipitado de 50ml
- 1 Piseta con agua destilada

Reactivos:

- Patrón de Calcio [10 mg/dl]
- HCl al 5%
- Reactivo Amortiguador
- Reactivo de color
- Solución "O" (misma utilizada en la práctica anterior)
- Orina
- Saliva



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	160/185

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex

SERVICIOS

- Agua
- Luz

PROCEDIMIENTO

1. Tomar 10 ml de solución "O" y transferirla a un matraz aforado de 100ml, etiquetándola como Solución "A".
2. De esta solución pipetear 10ml y transferirla nuevamente a un matraz aforado de 100ml, etiquetándola como solución "B" (problema).
3. Realizar una dilución de la muestra de orina de 1:10, utilizando un mililitro de orina y 9 mililitros de agua destilada.
4. Todos los tubos deberán ser lavados con HCl al 5% y ser enjuagados inmediatamente con agua destilada y etiquetados del 1 al 10.
5. Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:

[illegible]



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	161/185

6. Agitar en el vortex y dejar reposar durante 5 minutos. Adicionar las siguientes soluciones a cada tubo.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Patrón de calcio (ml)	-	0.05	0.10	0.15	0.20	-	-	-	-
Solución "B" (ml)	-	-	-	-	-	0.05	0.10	-	-
Saliva (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
Orina 1:10 (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05
Agua destilada	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.20	0.15	0.15	0.20

7. Agitar con el vortex y leer a 550nm en el espectrofotómetro, calibrando a 0% de absorbancia con el tubo 1.

A partir de los resultados obtenidos se debe calcular los equivalentes de calcio en la muestra de diente, saliva y orina y contrastarlos con el porcentaje referido en la bibliografía.

Para la realización de conversiones y cálculos puedes apoyarte en las tablas del sistema de unidades, sistema cartesiano y ejemplo de problema de componentes de diente que se encuentran como anexos de este manual.

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "B"
4. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos 6 y 7
5. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de calcio en cada uno de los tubos problema (6, 7, 8 y 9).
6. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución "B" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución "A" así como el porcentaje.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	162/185

8. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución “O” así como el porcentaje.
9. Reportar la concentración en mg de calcio en saliva así como el porcentaje.
10. Reportar la concentración en mg de calcio en orina así como el porcentaje.

CUESTIONARIO

- 1.- Escriba tres funciones básicas del calcio además de las citadas en la presente práctica
- 2.- Diga como interviene el calcio en la coagulación sanguínea
- 3.- ¿Cuál es la cantidad de calcio que requiere diariamente un adolescente, un paciente pediátrico y un adulto (hombre y mujer)?
- 4.- ¿Cuál es la concentración de calcio en las diferentes estructuras dentales?
- 5.- Diga qué relación tiene la calmodulina con el calcio.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA Y/O BIBLIOGRAFÍA

- Gitlman, H.J: Anal. Biochem. 18, 521 (1967)
- Henry, R.J.: Clinical Chemistry, Principles and Technics. Harper & Row Publisher. New York (1974)
- Martin, E.E.: Hazards of Medication. A manual on drug interactions, incompatibilities, contraindications and adverse effects, Lippincott, Philadelphia (1971)
- Mooredhead, W.R. and Briggs A.G.: Clin. Chem. 20,1458 (1974)
- Williams Elliot.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada 2a ed. Editorial El manual Moderno, México, 1990.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	163/185

PRÁCTICA 24

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE UREA EN DIENTE, SALIVA Y ORINA

OBJETIVO

Analizar los componentes orgánicos de diente, saliva y orina a través de un método espectrofotocolorimétrico para comprobar la presencia de urea en diente, saliva y orina.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

¿Qué es la urea?

¿Cómo se forma la urea?

Importancia de la urea en la cavidad bucal

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la cavidad oral, el amoníaco producido a través de la hidrólisis enzimática de la urea salival parece un factor importante en la inhibición del desarrollo de caries dentales. La ureolisis llevada a cabo por bacterias, puede ser un factor en la promoción de la formación de cálculo y puede contribuir a la progresión de la enfermedad periodontal mediante el aumento de los procesos inflamatorios.

Un nuevo enfoque en la investigación en caries se centra en el hecho de que la generación de álcali a partir de sustratos salivales, tales como urea y arginina, puede desempeñar un papel importante en el pH de la biopelícula, la homeostasis y en la inhibición de caries. Las dos fuentes principales de generación de álcali en la placa dental y saliva son a través de la hidrólisis de la urea por las enzimas ureasa y el metabolismo de la arginina por el sistema de la arginina desaminasa (ADS).

Se ha descrito que los sujetos con órganos dentarios resistentes a caries tienen una biopelícula más alcalina. En contraste, el riesgo de caries puede estar asociado con la pérdida de potencial de generación de álcali. La urea puede ser encontrada en las secreciones de las glándulas salivales en concentraciones similares a las del suero, oscilando entre 10.4 – 41.6 mg/dL.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	164/185

Por lo tanto, el amoníaco producido a partir de urea por ureolisis puede ser un importante factor endógeno inhibidor de la microbiota acidogénica y la caries en desarrollo, mediante la neutralización de ácidos y la estabilización de la microbiota oral.

En esta práctica la urea va a reaccionar con la diacetilmonoxima en presencia de tiosemicarbazida en medio ácido formando un derivado diazínico de color rosa púrpura. La concentración de urea presente en la muestra es proporcional a la intensidad del color formado.

El método propuesto es altamente específico para la urea. El producto formado en la reacción carabamido-diacetilo es estabilizado por la acción de tiosemicarbazida y por el ión férrico, que disminuye su fotosensibilidad e inhibe la interferencia de la hidroxilamina, linealizando la reacción.

MATERIAL Y REACTIVOS

Material por equipo:

- 11 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- 1 Gradilla
- 2 Pipeta de 10 ml
- 2 Pipetas de 5ml
- 5 Pipetas de 0.1ml
- 4 Vasos de precipitados de 1lt
- 1 Vaso de precipitado de 50ml
- 1 Matraz aforado de 100 ml
- 1 Piseta con agua destilada

Reactivos:

- Patrón de Urea: [80 mg/dL]
- Reactivo ácido
- Reactivo de color
- Solución "O" (misma utilizada en la práctica anterior)
- Orina
- Saliva



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	165/185

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex
- Planchas de calentamiento

SERVICIOS

- Agua
- Luz

PROCEDIMIENTO

1. Pipetear 10ml de la solución "O" y transferirlos a un matraz volumétrico de 100ml, aforar con agua destilada y etiquetar como solución "A"(problema).
2. Realizar una dilución 1:10 de la orina.
3. Etiquetar los tubos del 1 al 10 y añadir a cada uno de ellos 2.5 ml de reactivo de color.
4. Posteriormente preparar los tubos de la siguiente manera:

Tubo	Patrón de urea (ml)	Saliva (ml)	Orina diluida (1:10) ml	Solución problema (solución "A") ml	Agua destilada (ml)
1	--	--	--	--	0.04
2	0.01	--	--	--	0.04
3	0.02	--	--	--	0.03
4	0.03	--	--	--	0.02
5	0.04	--	--	--	0.01
6	0.05	--	--	--	--
7	--	0.02	--	--	0.02
8	--	0.04	--	--	--
9	--	--	0.01	--	0.03
10	--	--	--	0.02	0.02



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	166/185

5. Una vez que se han preparados los tubos, colocar 2.5ml de reactivo ácido a cada uno de ellos.
6. Mezclar en el vortex y colocarlos en baño de agua en ebullición durante 10 minutos.
7. Al concluir el tiempo, transferirlos a agua fría durante 3 minutos.
8. Leer en espectrofotómetro a 520nm de longitud de onda utilizando el tubo 1 para calibrar a 0% de absorbancia. La coloración es estable por 60 minutos.

A partir de los resultados obtenidos se debe calcular los equivalentes de urea en la muestra de diente, saliva y orina y contrastarlos con el porcentaje referido en la bibliografía.

Para la realización de conversiones y cálculos puedes apoyarte en las tablas del sistema de unidades, sistema cartesiano y ejemplo de problema de componentes de diente que se encuentran como anexos de este manual.

VALORES DE REFERENCIA

Sangre - suero: 15 - 40 mg/dL.

Saliva: 10.4 - 41.6 mg/dL

Saliva estimulada: .6 - 30 mg/dL.

Orina: 25 - 43 g/24 hrs.

Rango normal de orina de 24 hrs: 800 - 2000 mL.

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta el tubo 10.
4. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de urea en cada uno del tubo problema (7, 8, 9 y 10).
5. Reportar la concentración en mg de urea en la solución "A" así como el porcentaje.
6. Reportar la concentración en mg de urea en la solución "O" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de urea en saliva así como el porcentaje.
8. Reportar la concentración en mg de urea en orina así como el porcentaje.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	167/185

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las concentraciones de urea citadas en diversas bibliografías?
2. ¿Cuál es el papel de la urea en la formación del cálculo dental?
3. ¿Cuál es el papel de la urea en la halitosis?

BIBLIOGRAFÍA

- Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett. 2000 Dec 1; 193(1):1-6.
- Reyes E, Martin J, Moncada G, et al. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. Journal of Applied Oral Science. 2014; 22(3):235-240.
- Morou-Bermudez E, Burne RA. Analysis of urease expression in *Actinomyces naeslundii* WVU45. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):6670-6.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	168/185

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Para tener derecho a evaluación ordinaria, al alumno deberá tener 80% de asistencia como mínimo en las prácticas de laboratorio. La evaluación de laboratorio es determinada para cada alumno con base en:

- El trabajo desarrollado durante la práctica
- La entrega del reporte de práctica así como su contenido
- La evaluación formativa

Laboratorio 30%

10% Asistencia
10% Diagrama de flujo
30% Reporte de práctica
30% Exámenes parciales
20% Mapa conceptual de conocimientos previos

El reporte de práctica deberá ser entregado en la siguiente sesión de laboratorio, en el momento de tomar la asistencia en el mismo manual de prácticas.

Resultados: Describir, dibujar, esquematizar, elaborar tablas y gráficas y/o realizar los cálculos de los resultados de los procesos o reacciones que se llevaron a cabo en la práctica. Interpretar los resultados obtenidos y cotejarlos con la bibliografía, así como la resolución del cuestionario.

La evaluación de los reportes de práctica utilizarán los siguientes criterios:

Apartado	Puntaje
- Resultados	2.5
- Análisis de resultados	2.5
- Conclusiones	2.0
- Cuestionario	2.0
- Bibliografía	1.0



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	169/185

Las evaluaciones formativas se llevarán a cabo con exámenes parciales de laboratorio (tres para microbiología y dos para bioquímica), tomando como calificación aprobatorio 6 (seis). En caso de no obtener esa calificación mínima, el alumno tendrá la oportunidad de realizar una primera y segunda vuelta. Para tener una calificación promediable, es necesario que todos los exámenes de laboratorio sean aprobatorios.

Es indispensable una calificación aprobatoria en laboratorio para que pueda ser promediable con la calificación de teoría ya que cualquiera de no ser así, el alumno automáticamente reprobará el módulo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	170/185

REGLAMENTOS DE LOS LABORATORIOS

Reglamento de laboratorio de Microbiología L-111 y L-112

1. Toda persona que permanezca en el laboratorio deberá portar una bata blanca de algodón y manga larga, completamente abotonada.
2. La asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y por lo tanto, se pasará asistencia al inicio de la sesión.
3. No se permitirá la entrada a ningún alumno después de haber transcurrido 15 minutos del inicio de la práctica.
4. El grupo en general, es responsable de mantener limpio y en buen estado el equipo y material del laboratorio durante la práctica.
5. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formarán equipo con el número de personas que designe el profesor responsable.
6. Todos los alumnos que integran el equipo deberá limpiar el área de trabajo con desinfectante, así como lavar el material que sea suministrado para la realización de la práctica, antes de ocuparlo y al término de la actividad cuando sea indicado por el profesor o responsable del laboratorio.
7. El material necesario para desarrollar la práctica deberá ser solicitado en el interlaboratorio, utilizando un vale impreso expresamente para tal fin y adjuntando a éste, la credencial del alumno que firma el vale.
8. Al recibir el material, el usuario debe verificar que esté completo y sin daños.
9. Todo material que sea devuelto al interlaboratorio deberá estar completo y sin daños.
10. En el caso de ser material que requiera ser guardado en el interlaboratorio para su posterior observación, deberá ser etiquetado con una leyenda que incluya número de equipo, grupo y fecha; así como presentarse a la lectura de resultados en el período de tiempo establecido por el profesor.
11. Las cepas que son utilizadas para el desarrollo de las prácticas deberán ser manipuladas a una distancia no mayor de 20 cm del mechero y desecharlas según las indicaciones del personal responsable del interlaboratorio.
12. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante;



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	171/185

- teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.
13. El alumno sólo podrá utilizar los aparatos que hay en el laboratorio durante el transcurso de la práctica y bajo supervisión de un profesor.
 14. Cada equipo deberá traer para cada una de las prácticas, el material que indique el profesor como es:
 - a. Un rollo de masking tape
 - b. Jabón para manos
 - c. Toallas desechables para secarse las manos
 - d. Algodón
 - e. Benzal
 - f. Marcador indeleble
 - g. Papel seda
 - h. Asa bacteriológica
 - i. Material adicional que se requiera para cada práctica
 15. Se debe mantener limpio el laboratorio y se prohíbe hacer uso inadecuado de las instalaciones.
 16. Se prohíbe fumar, maquillarse, ingerir alimentos y/o bebidas en el interior del laboratorio.
 17. Durante su estancia en el laboratorio se prohíbe la utilización de aparatos electrónicos debido a que se utiliza material biológico ya que puede provocar su contaminación.
 18. Se prohíbe el paso al laboratorio, a cualquier persona ajena.
 19. Al finalizar cada práctica, los alumnos deberán lavarse las manos para evitar infecciones.
 20. Las personas que no respeten las indicaciones de este reglamento se harán acreedoras a las sanciones que determinen los profesores o las personas responsables de laboratorio.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	172/185

Reglamento de laboratorio de Bioquímica L-223 y L-224

1. Toda persona que permanezca en el laboratorio deberá portar una bata blanca de algodón y manga larga, completamente abotonada.
2. La asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y por lo tanto, se pasará asistencia al inicio de la sesión.
3. No se permitirá la entrada a ningún alumno después de haber transcurrido 15 minutos del inicio de la práctica.
4. El grupo en general, es responsable de mantener limpio y en buen estado el equipo y material del laboratorio durante la práctica.
5. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formarán equipo con el número de personas que designe el profesor responsable.
6. Todos los alumnos que integran el equipo deberá lavar el material que sea suministrado para la realización de la práctica, antes de ocuparlo y al término de la actividad.
7. El material necesario para desarrollar la práctica deberá ser solicitado en el interlaboratorio, utilizando un vale impreso expresamente para tal fin y adjuntando a éste, la credencial del alumno que firma el vale.
8. Al recibir el material, el usuario debe verificar que esté completo y sin daños.
9. Todo material que sea devuelto al interlaboratorio deberá estar completo y sin daños.
10. Las sustancias químicas que son utilizadas para el desarrollo de las prácticas deberán ser manipuladas con precaución para evitar accidentes de quemadura y desecharlas según las indicaciones del personal responsable del interlaboratorio en el área para su disposición.
11. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante; teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.
12. El alumno sólo podrá utilizar los aparatos que hay en el laboratorio durante el transcurso de la práctica y bajo supervisión de un profesor.
13. Cada equipo deberá traer para cada una de las prácticas, el material que indique el profesor como es:
 - a. Un rollo de masking tape



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	173/185

- b. Jabón para manos
 - c. Toallas desechables para secarse las manos
 - d. Marcador indeleble
 - e. Material adicional que se requiera para cada práctica
14. Se debe mantener limpio el laboratorio y se prohíbe hacer uso inadecuado de las instalaciones.
15. Se prohíbe fumar, maquillarse, ingerir alimentos y/o bebidas en el interior del laboratorio.
16. Se prohíbe el paso al laboratorio, a cualquier persona ajena.
17. Al finalizar cada práctica, los alumnos deberán lavarse las manos para eliminar cualquier residuo químico con el que pudieron estar en contacto.
18. Las personas que no respeten las indicaciones de este reglamento se harán acreedoras a las sanciones que determinen los profesores o las personas responsables de laboratorio.

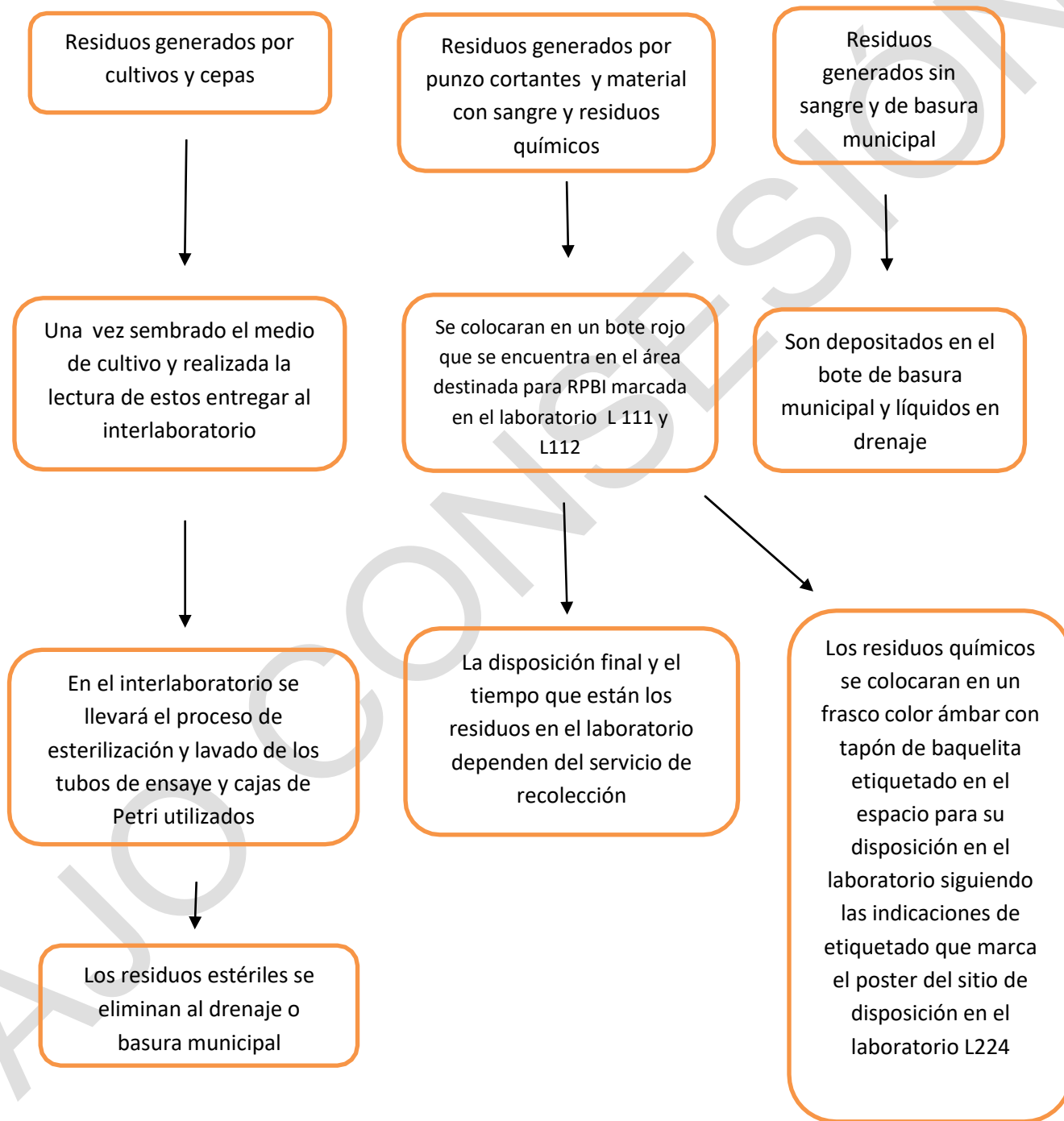


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	174/185

MANEJO DE RESIDUOS





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	175/185

ANEXOS



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	176/185

ANEXO 1

Morfología Colonial

Tamaño se mide en mm

Forma



puntiforme

circular

filamentosa

irregular

rizoide

fusiforme

Elevación



plana

elevada

convexa

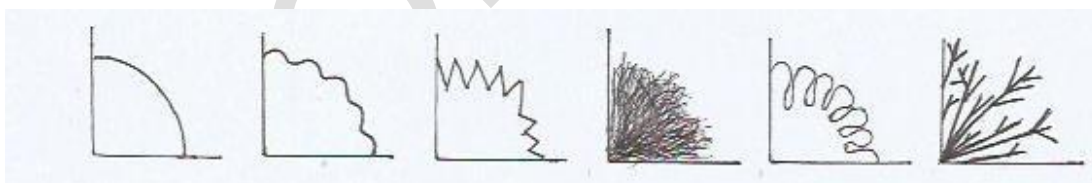
cóncava

monticulada

umbonada

umbilicada

Bordes



entero

ondulado

erosionado

filamentoso

lobulado

rizado

Superficie lisa, rugosa

Brillo transparente, translúcida, opaca

Color blanca, amarilla, negra, verde tornasol, etc.

Aspecto viscosa, húmeda, gelatinosa, lechosa, butirosa, gelatinosa, pulvinada, etc.

Hemólisis α -hemólisis (parcial), β -hemólisis (total), γ -hemólisis (no hemólisis).

Elaborado por: Pamela Montserrat Ríos Hernández



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	177/185

ANEXO 2

SISTEMA DE UNIDADES

El Sistema Internacional de Unidades (SI) incluye unidades fundamentales de longitud, masa, tiempo, entre otras, y como unidades derivadas al área, volumen y velocidad. A continuación se presentan las unidades del sistema internacional y sus equivalencias con múltiplos y submúltiplos.

Masa → Gramo (g)

Volumen → Litro (l)

Prefijo	Símbolo	Valor	Equivalencia en unidades
Tera	T	1×10^{12}	Billón
Giga	G	1×10^9	Mil millones
Mega	M	1×10^6	Millón
Kilo	k	1×10^3	Mil
Hecto	h	1×10^2	Cien
Deca	da	1×10^1	Diez
Unidad	1	1	Uno
Deci	d	1×10^{-1}	Décima
Centi	c	1×10^{-2}	Centésima
Mili	m	1×10^{-3}	Milésima
Micro	μ	1×10^{-6}	Millonésima
Nano	n	1×10^{-9}	Mil millonésima
Pico	p	1×10^{-12}	Billonésima
Femto	f	1×10^{-15}	Mil billonésima
Atto	a	1×10^{-18}	Trillonésima

Ejemplo de conversión

¿Cuántos microgramos hay en 3.475mg?

Sabemos que $1 \mu\text{g}$ equivale a 1×10^{-6} , mientras que 1mg equivale a 1×10^{-3} , es decir que 1mg es 1000 veces mayor a $1\mu\text{g}$, entonces $1\text{mg} = 1000\mu\text{g}$.

$$\begin{array}{ccc}
 1\text{mg} & \xleftrightarrow{-} & 1000\mu\text{g} \\
 3,475\text{mg} & \xleftrightarrow{-} & X
 \end{array}
 \qquad
 3.475\text{mg}(1000 \mu\text{g}) / 1\text{mg} = \boxed{3475\mu\text{g}}$$



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



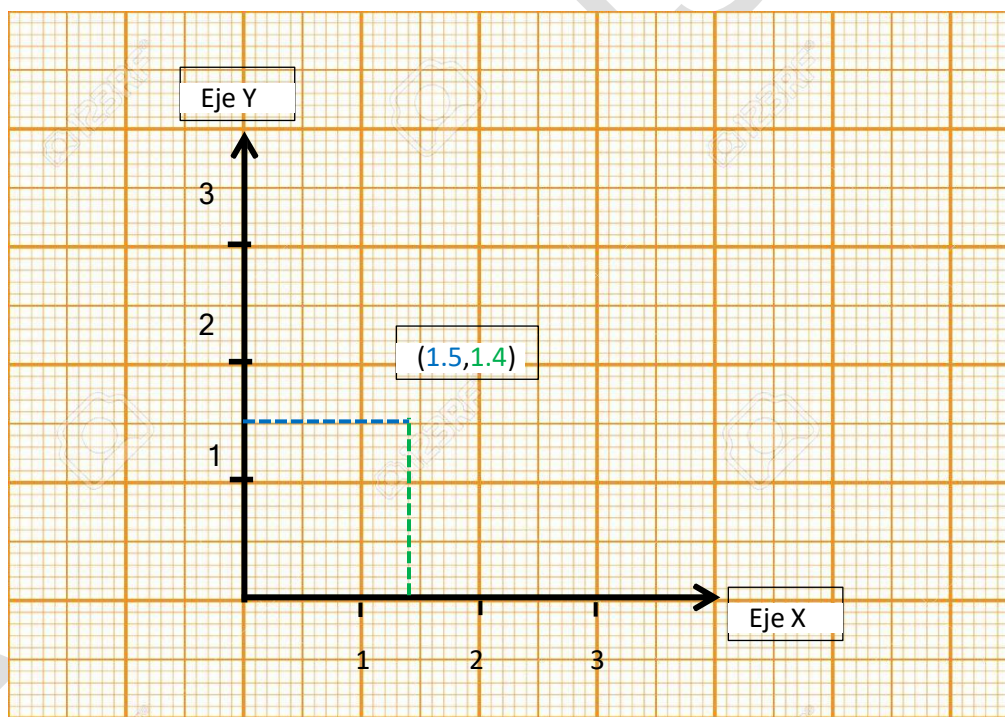
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	178/185

ANEXO 3

SISTEMA CARTESIANO

El sistema cartesiano se genera como resultado de la intersección de dos rectas perpendiculares entre sí formándose cuatro regiones que reciben el nombre de cuadrantes. Cada cuadrante está delimitado por un componente horizontal (X) y uno vertical (Y) con las siguientes características:

- El punto de intersección de las dos rectas perpendiculares recibe el nombre de **origen**.
- La línea horizontal recibe el nombre de eje de la X o de las abscisas.
- La línea vertical recibe el nombre de eje de la Y o de las ordenadas.
- Los puntos que se representan se dan por pares de valores (X, Y)





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	179/185

ANEXO 4

EJEMPLO DE PROBLEMA DE COMPONENTES DE DIENTE

1. Leer el procedimiento de la práctica

Aforar la solución "O" preparada con anterioridad a 100 ml. De esta solución pipetear 5.0 ml y homogeneizar esta solución y anotar las características físicas, aforar esta solución y etiquetar como solución "C".

Preparar una serie de 7 tubos etiquetando del 1 al 7 de la siguiente manera:

Tubo	Agua destilada (ml)	Estándar de proteína (ml)	Solución "C" (ml)
1	1.0	0	-
2	0.5	-	0.5
3	-	-	1.0
4	0.9	0.1	-
5	0.8	0.2	-
6	0.7	0.3	-
7	0.5	0.5	-

2. Obtener la cantidad de diente en todas las soluciones problema

Cada grupo trituró 5 ó 6 dientes naturales y posteriormente se pesó el polvo obtenido. Para ejemplificar se utilizará 5.3826g de diente.

- La solución original "O" tiene un peso de 5.3826g de diente con un volumen de 100ml ya que en el procedimiento se indicó que debería ser aforado. Es necesario convertir el peso del diente de gramos a miligramos (esto se puede realizar mediante una regla de tres).

$$\begin{array}{lcl} 1\text{g} & - & 1000\text{mg} \\ 5.3826\text{g} & - & x \end{array} \quad 5.3826 \times 1000 / 1 = \quad \boxed{x = 5382.6\text{mg de diente en Sol "O"}}$$

$\boxed{\text{Volumen} = 100\text{ml}}$

- De la solución "O" se pipeteó 5.0ml de su contenido y se vertió en otro matraz aforado de 100ml. Ahora se debe determinar la cantidad de diente que fue transferido al segundo matraz tomando como referencia los valores obtenidos de la solución "O".

$$\begin{array}{lcl} 5382.6\text{mg diente Sol "O"} & --- & 100\text{ml} \\ x & --- & 5\text{ml} \end{array} \quad 5 \times 5382.6 / 100 = \quad \boxed{x = 269.13\text{mg de diente en segundo matraz}}$$

- A esta solución se le agregan 5.0ml de hidróxido de sodio al 1.5N, se homogeneiza, se afora y se le denominará "C".

$$\boxed{\text{Sol "C"} = 269.13\text{mg de diente}}$$
$$\boxed{\text{Vol} = 100\text{ml}}$$



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	180/185

- De la solución "C" se pipetea 0.5ml para preparar el tubo problema número 2, mientras que al tubo número 3 se le adiciona 1.0ml de esta misma solución. Utilizando los valores de la solución "C", se debe determinar la cantidad de diente de los tubos problema.

Tubo 2

269.13mg diente Sol "C" --- 100ml
x --- 0.5ml

$$0.5 \times 269.13 / 100 =$$
$$x = 1.34 \text{mg diente en tubo 2}$$

Tubo 3

269.13mg diente Sol "C" --- 100ml
x --- 1.0ml

$$1.0 \times 269.13 / 100 =$$
$$x = 2.69 \text{mg diente en tubo 3}$$

3. Realizar una curva patrón con los datos obtenidos con el espectrofotómetro

Para realizar una curva patrón es necesario tener un cuadro con dos: el primer dato son los miligramos de proteína que contiene cada tubo y que se obtienen mediante una regla de tres utilizando el estándar (STD) que se encuentra en los reactivos de cada práctica. Para este ejercicio, el STD = 1mg/ml. El tubo 1 no contiene proteína, mientras que el 2 y 3 al no conocerlo lo debemos obtener de la curva patrón.

Tubo	Proteína (ml)	Proteína (mg)
1	0	0
2	-	-
3	-	-
4	0.1	0.1
5	0.2	0.2
6	0.3	0.3
7	0.5	0.5

Tubo 4

STD 1mg --- 1ml

$$0.1 \times 1 / 1 =$$
$$x = 0.1 \text{mg}$$

x --- 0.1ml

Tubo 5

STD 1mg --- 1ml

x --- 0.2ml

$$0.2 \times 1 / 1 =$$
$$x = 0.2 \text{mg}$$

Tubo 6

STD 1mg --- 1ml

$$0.3 \times 1 / 1 =$$
$$x = 0.3 \text{mg}$$

x --- 0.3ml

Tubo 7

STD 1mg --- 1ml

x --- 0.5ml

$$0.5 \times 1 / 1 =$$
$$x = 0.5 \text{mg}$$

En este ejemplo hay equivalencia entre los miligramos y mililitros de proteína, lo cual no sucederá en otros ejercicios (carbohidrato, calcio, fósforo y urea), por lo tanto, será indispensable realizar las reglas de tres para transformar el STD de mililitros a miligramos.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS

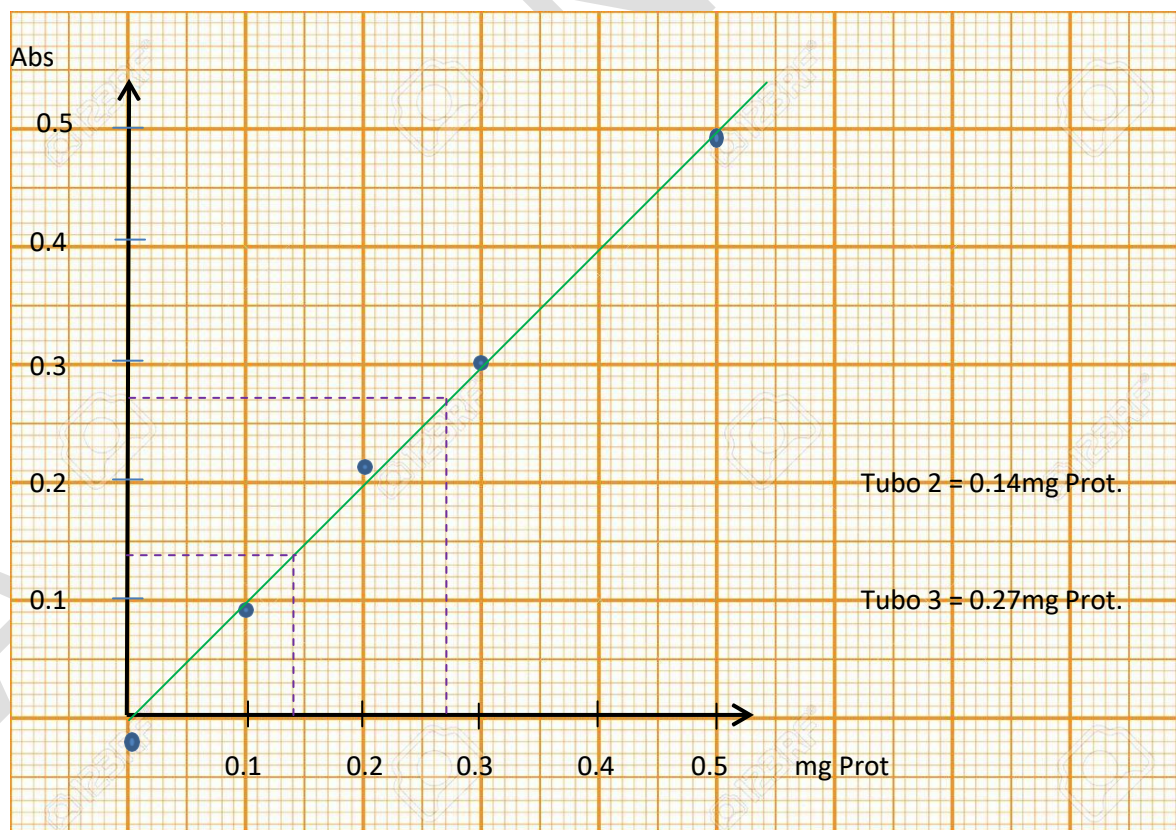


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	181/185

El segundo dato se obtiene al realizar la práctica a través del resultado del espectrofotómetro. Para continuar con este ejercicio, los resultados de absorbancia (Abs) se ejemplifica con los siguientes:

Tubo	Estándar de proteína (mg)	Abs
1	0	0
2	-	0.14
3	-	0.27
4	0.1	0.10
5	0.2	0.21
6	0.3	0.30
7	0.5	0.49

Una vez que se han obtenido dos datos para cada tubo, es posible continuar con la gráfica que se realizará en papel milimétrico utilizando todos los tubos, excepto 2 y 3. Los miligramos de proteína se grafican en el eje de la "x" y la absorbancia en el eje de la "y". (marcado con puntos azules)





SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	182/185

Una vez que están ubicados los datos en la gráfica, se deben unir todos los puntos mediante una línea recta. En caso de que los puntos no se encuentren alineados entonces se trazará una línea pasando por la mayoría de los puntos o sin tocar ninguno pero cerca de todos ya que esto eliminará el error de pipeteo durante la práctica. (línea continua color verde)

Al tener la curva patrón, ya es posible obtener los miligramos de proteína de los tubos problema al traspasar el dato existente de absorbancia. Esto se realiza trazando una línea horizontal iniciando en la Abs del tubo 2 y concluyendo en la curva patrón, después se hace una línea vertical de la curva patrón hacia el eje de la "x", y ahí se obtendrá la cantidad de proteína del primer tubo problema. El segundo tubo problema se obtiene de la misma manera. (líneas discontinuas color morado)

4. Determinar la concentración de proteína en las soluciones y tubos problema, así como el porcentaje

Con los resultados obtenidos anteriormente en el numeral 2 y en la gráfica del tubo 2, se determinará la concentración y el porcentaje de proteínas de la solución "C" y "O" mediante reglas de tres.

Tubo 2

1.34mg diente tubo 2	---	0.14mg proteína tubo 2		$269.13 \times 0.14 / 1.34 =$
269.13mg diente Sol "C"	---	x		$x = 28.11 \text{mg proteína Sol "C"}$

269.13mg diente Sol "C"	---	100%		$28.11 \times 100 / 269.13 =$
28.11mg proteína Sol "C"	---	x		$x = 10.44\% \text{ proteína Sol "C"}$

1.34mg diente tubo 2	---	0.14mg proteína tubo 2		$5382.6 \times 0.14 / 1.34 =$
5382.6mg diente Sol "O"	---	x		$x = 562.36 \text{mg proteína Sol "O"}$

5382.6mg diente Sol "O"	---	100%		$562.36 \times 100 / 5382.6 =$
562.36mg proteína Sol "O"	---	x		$x = 10.44\% \text{ proteína Sol "O"}$

La igualdad de los porcentajes es indicativo de la correcta resolución del problema. Otra manera de corroborar el resultado es repitiendo las reglas de tres del numeral 4 pero es necesario cambiar los datos del tubo 2 por los del 3.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	183/185

Tubo 3

2.69mg diente tubo 3 --- 0.27mg proteína tubo 3

269.13mg diente Sol "C" --- x

$$269.13 \times 0.27 / 2.69 =$$

$$x = 27.01 \text{mg proteína Sol "C"}$$

269.13mg diente Sol "C" --- 100%

27.01mg proteína Sol "C" --- x

$$27.01 \times 100 / 269.13 =$$

$$x = 10.03\% \text{ proteína Sol "C"}$$

2.69mg diente tubo 3 --- 0.27mg proteína tubo 3

5382.6mg diente Sol "O" --- x

$$5382.6 \times 0.27 / 2.69 =$$

$$x = 540.26 \text{mg proteína Sol "O"}$$

5382.6mg diente Sol "O" --- 100%

540.26mg proteína Sol "O" --- x

$$540.26 \times 100 / 5382.6 =$$

$$x = 10.03\% \text{ proteína Sol "O"}$$

De igual forma que en el tubo 2, los resultados porcentuales son idénticos y aunque los resultados entre los tubos 2 y 3 no son idénticos, si son muy similares.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	184/185

ANEXO 5

MAPA CONCEPTUAL

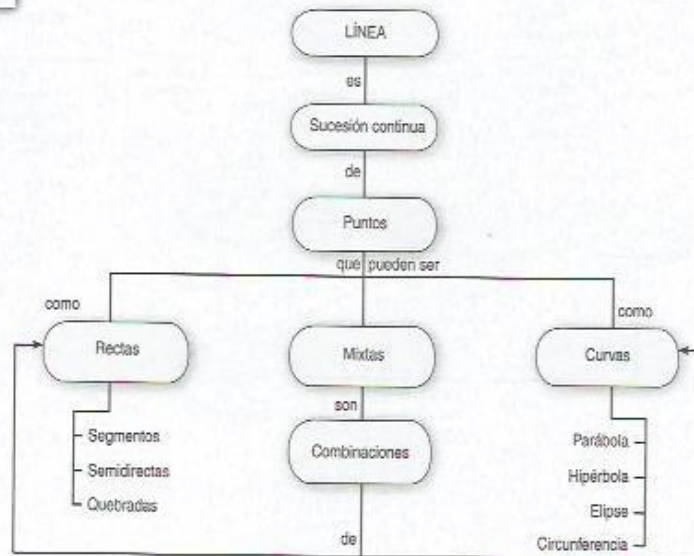
Mapa conceptual

Es una estrategia mediante la cual los diferentes conceptos y sus relaciones pueden representarse fácilmente. Los conceptos guardan entre sí un orden jerárquico y están unidos con líneas identificadas por palabras (de enlace) que establecen la relación que hay entre ellos.

Construcción:

- Leer y comprender el texto.
- Localizar y subrayar las ideas o palabras más importantes (palabras clave).
- Determinar la jerarquización de dichas palabras clave.
- Establecer las relaciones entre ellas.
- Es conveniente unir los conceptos usando líneas que se interrumpen con palabras que no son conceptos, lo cual facilita la identificación de las relaciones.
- Utilizar correctamente la simbología:
 - Ideas o conceptos.
 - Conectores.
 - Flechas (se pueden usar para acentuar la direccionalidad de las relaciones).

Ejemplo 1:



Fuente: Pimienta, J. (2008). Constructivismo. 3ª ed. México: Pearson



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD
MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO BIOLOGÍA
BUCAL Y BASES FARMACOLÓGICAS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	22/Enero/2020	0	185/185

ANEXO 6

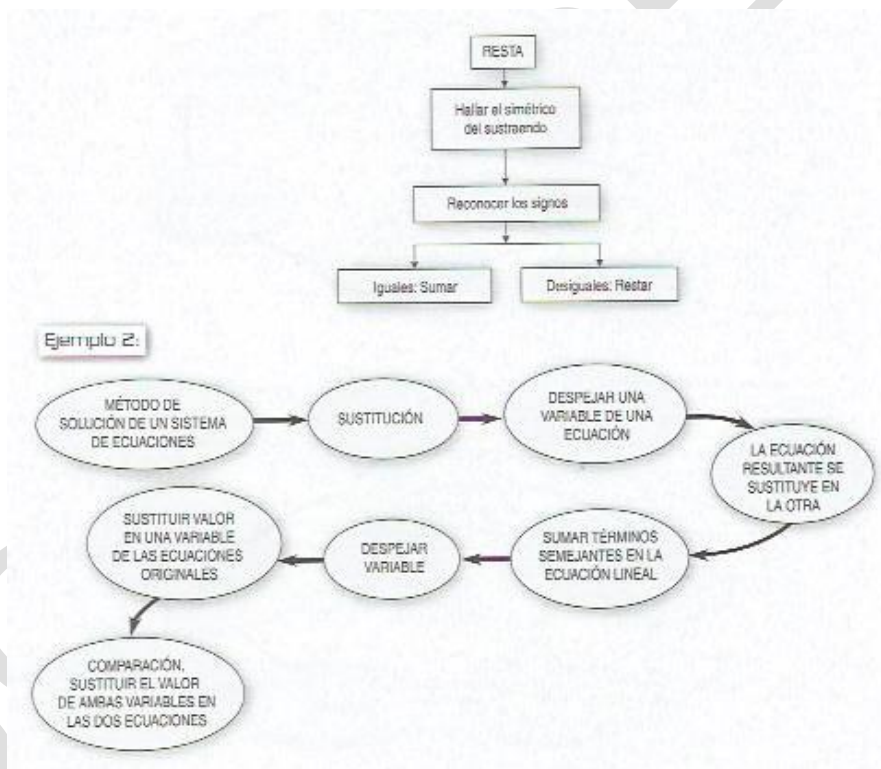
DIAGRAMA DE FLUJO

¿Qué es?

Es un esquema o diagrama que simula una cadena continua de temas con secuencia cronológica.

¿Cómo se realiza?

- En el primer círculo se anota el título del tema.
- En los siguientes círculos se anotan los pasos o las etapas que se requieren para llegar a la solución.



Fuente: Pimienta, J. (2012). Estrategias de enseñanza-aprendizaje. México: Pearson.