

Curso de Biología Celular

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

- 2020 -

Guías de trabajos prácticos de laboratorio

Docentes:

- Walter Berón
- Lorena Carvelli
- Natalia Leiva
- Miguel A. Sosa

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N°1: PROTEÍNAS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Introducción: Todas las membranas biológicas están compuestas por lípidos y proteínas. Los lípidos se organizan estructuralmente en una doble capa en la que las proteínas se asocian de diferente manera. Las proteínas con características lipofílicas pueden asociarse en forma integral con la membrana, mientras que otras, de naturaleza hidrofílica, se asocian a la membrana sin integrarse a la bicapa lipídica.

Objetivos: determinar experimentalmente la asociación de las proteínas de membrana de glóbulos rojos.

Parte I: Obtención y tratamiento de membranas de glóbulos rojos

Procedimientos realizados previamente por los docentes.

Métodos: Se obtendrán membranas de glóbulos rojos para separar proteínas periféricas e integrales por tratamientos específicos. Las proteínas extraídas serán analizadas por electroforesis en geles de poliacríamida.

Materiales:

- EDTA: 0.27 M EDTA en H₂O bidestilada.
- Solución isotónica: 0.15 M NaCl
- solución hipotónica: 20 mM buffer Tris-HCl, pH 7.4.
- PBS: 10 mM K₂HPO₄, pH 7.2, 150 mM NaCl
- NaCl: 0.3 M de NaCl en H₂O
- Citrato: 0.25 M citrato, pH 4.5
- Buffer Tris: 0.02 M Tris, pH 10.0
- Tritón-PBS: 0.2% tritonX-100 en PBS.

Procedimiento Experimental:

a) Obtención de fantasmas de glóbulos rojos:

- extraer 5 ml de sangre de la vena mediana del antebrazo
- verter en un tubo que contiene 0.1 ml de EDTA (anticoagulante) y mezclar suavemente.

b) Lavado de los glóbulos rojos:

- mezclar 3 ml de la sangre con 10 ml de solución isotónica de NaCl (0.15 M)
- centrifugar durante 5 min a 3.000 rpm en centrífuga de mesa.
- resuspender el sedimento en 5 ml de la solución isotónica.
- centrifugar a 3.000 rpm durante 5 min.

c) Hemólisis: resuspender el sedimento en 10 ml de una solución hipotónica (buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.4).

- incubar 10 min en hielo.
- centrifugar a 3500 rpm durante 10 min. Descartar sobrenadante.

- resuspender el sedimento en 1 ml de la solución hipotónica y centrifugar a 15000g durante 20 min.
- Repetir el paso anterior (hasta 3 veces) para eliminar los restos de hemoglobina.
- resuspender el sedimento final en 0.5 ml de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 (fantasmas de glóbulos rojos).

A partir de este punto comienzan a trabajar los alumnos en el laboratorio:

- Alicuotar 100 μ l de cada muestra en tubos de microcentrifuga (rotular los tubos del P1 al P5)
- centrifugar a 13000 rpm en microcentrifuga durante 10 min.
- eliminar el sobrenadante y tratar el sedimento como se explica en la siguiente sección.

d) Tratamiento de los sedimentos:

- 1) Tratamiento 1: resuspender el sedimento P1 en 100 μ l de NaCl.
- 2) Tratamiento 2: resuspender el sedimento P2 en 100 μ l de Citrato
- 3) Tratamiento 3: resuspender el sedimento P3 en 100 μ l de buffer Tris.
- 4) Tratamiento 4: resuspender el sedimento P4 en 100 μ l de Tritón-PBS.
- 5) Control: resuspender el sedimento P5 en 100 μ l de PBS.

- agitar vigorosamente en Vortex.
- incubar 10 min a temperatura ambiente.
- centrifugar 15 min a 13000 rpm en microcentrifuga.
- recuperar el sobrenadante
- preparar el sobrenadante para el análisis electroforético.

e) Preparación de las muestras para electroforesis:

- agregar 33 μ l de buffer de Laemmli (4X) a los 100 μ l de cada muestra.
- preparar un control de proteínas totales con 5 μ l de la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos más 5 μ l de buffer de Laemmli.
- incubar las muestras a 95°C durante 5 min.

Parte II: Análisis electroforético de las proteínas obtenidas en la parte I.

Métodos: Las muestras obtenidas se analizarán por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los geles serán realizados por los docentes previamente. En clase se realizará una demostración del armado del gel.

Materiales:

- Accesorios para electroforesis (placas de vidrios, espaciadores, peine, soporte armador de geles, soporte con electrodos, cuba, tapa conectora, fuente de poder)
- Soluciones: A: 30 % Acrilamida, 0,8 % Bis-acrilamida en H₂O.
B: 0.4 % SDS en 1.5 M Tris-ClH pH 8.8
C: 0.4 % SDS en 0.5 M Tris-ClH, pH 6.8
APS: 10 % Persulfato de Amonio en H₂O.

- Buffer de Laemmli: 2 % SDS
2 % Tris
20 % Glicerol
0.004% Azul de Bromofenol
10 % 2-Mercapto-Etanol
pH: 6.8
- Solución de azul de Coomassie: 0.1 % Azul de Coomassie
50 % Metanol
10 % Acido acético glacial.
- Decolorante: 5 % metanol
10 % ácido acético glacial.
- Buffer de corrida: 0.3 % Tris
1 % Glicina
0.1 % SDS
pH: 8.8

Procedimiento Experimental:

- a) Preparación de geles de poliacrilamida:
- ensamblar a modo de sandwich dos placas de vidrio separadas por dos espaciadores
- colocar el sandwich en el soporte armador de geles para el llenado.
- preparar el gel resolutivo al 7.5% mezclando los componentes según la siguiente tabla:

Gel resolutivo (10 ml)

Acrilamida	5.0 %	7.5 %	10.0 %	12.5 %	15.0 %
Solución					
Sol.A	1.75 ml	2.62 ml	3.50 ml	4.37 ml	5.25 ml
Sol.B	2.50 ml	2.50 ml	2.50 ml	2.50 ml	2.50 ml
10 % APS	83.5 µl	83.5 µl	83.5 µl	83.5 µl	83.5 µl
H ₂ O bidestilada	5.65 ml	4.88 ml	3.90 ml	2.90 ml	7.84 ml
TEMED (µl)*	8.5 µl	8.5 µl	8.5 µl	8.5 µl	8.5 µl

* IMPORTANTE: el TEMED debe agregarse en último término.

- Agitar y cargar la mezcla rápidamente en el sandwich hasta hasta 1 cm por debajo de su borde superior para minigeles o hasta 2 cm en el caso de geles grandes.
- Agregar H₂O bidestilada hasta completar el sandwich
- Esperar 15-30 min para la gelificación
- Lavar el interior del sandwich con H₂O bidestilada.

b.2. Prepara el gel de empaquetamiento mezclando los componentes según la siguiente tabla:

Gel de compactación (2.5 ml)

Acrilamida	4.0 %
Solución	
Sol.A	0.33 ml
Sol.C	0.62 ml
10 % APS	25 μ l
H ₂ O bidestilada	1.50 ml
TEMED (μ l)*	2.5 μ l

* IMPORTANTE: el TEMED debe agregarse en último término.

- Agitar y cargar la mezcla rápidamente en el sandwich llenar el espacio remanente del sandwich.
- Colocar inmediatamente el peine antes de la gelificación.
- Esperar hasta que se forme el gel.
- Remover el peine cuidadosamente para no dañar los espacios formados (calles de siembra).

c) Montaje de la cuba y corrida electroforética:

- Montar el sandwich conteniendo el gel en el soporte con electrodos de tal forma que la parte superior del sandwich quede comunicada con el cátodo (polo negativo). La parte inferior del sandwich quedará comunicada con el ánodo (polo positivo).
- Introducir en la cuba. De esta forma se forman dos compartimientos.
- Llenar los dos compartimientos con buffer de corrida.

Procedimiento realizado por los alumnos en el laboratorio a partir de este punto:

d) Sembrado de las muestras:

- Introducir las muestras (25-30 μ l) en las calles de siembra con micropipeta
- Colocar la tapa conectora sobre la cuba
- Conectar la tapa conectora a la fuente de poder.
- Ajustar la intensidad de corriente a 20-25 mA (100-110 V) en la fuente de poder.

La corrida será controlada por el avance de la línea azul (frente de corrida). Cuando el frente de corrida llegue a unos 5 mm por arriba del final del gel:

- Desconectar la fuente de poder y la tapa conectora
- Extraer el soporte de electrodos y desarmar el sandwich con precaución.
- Extraer el gel con sumo cuidado.

d) Tinción del gel:

- Incubar el gel con solución de azul de Coomassie (fijador y colorante) por 10-20 min a 60°C con agitación.
- Remover el colorante y agregar solución decolorante a 60°C. Decolorar hasta que se observen las bandas de proteínas en forma nítida.
- Remover el decolorante y adicionar H₂O.
- Secar el gel entre dos hojas de papel celofán.

INTERPRETACION Y CONCLUSIONES: se observarán las bandas y se deducirá su peso molecular aproximado comparando con un estándar de pesos moleculares conocidos. Se tratará de identificar algunas de las proteínas y se deducirá cuáles de ellas son intrínsecas y cuáles extrínsecas.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N° 2: TRANSPORTE MEDIADO POR CILIOS Y FLAGELOS

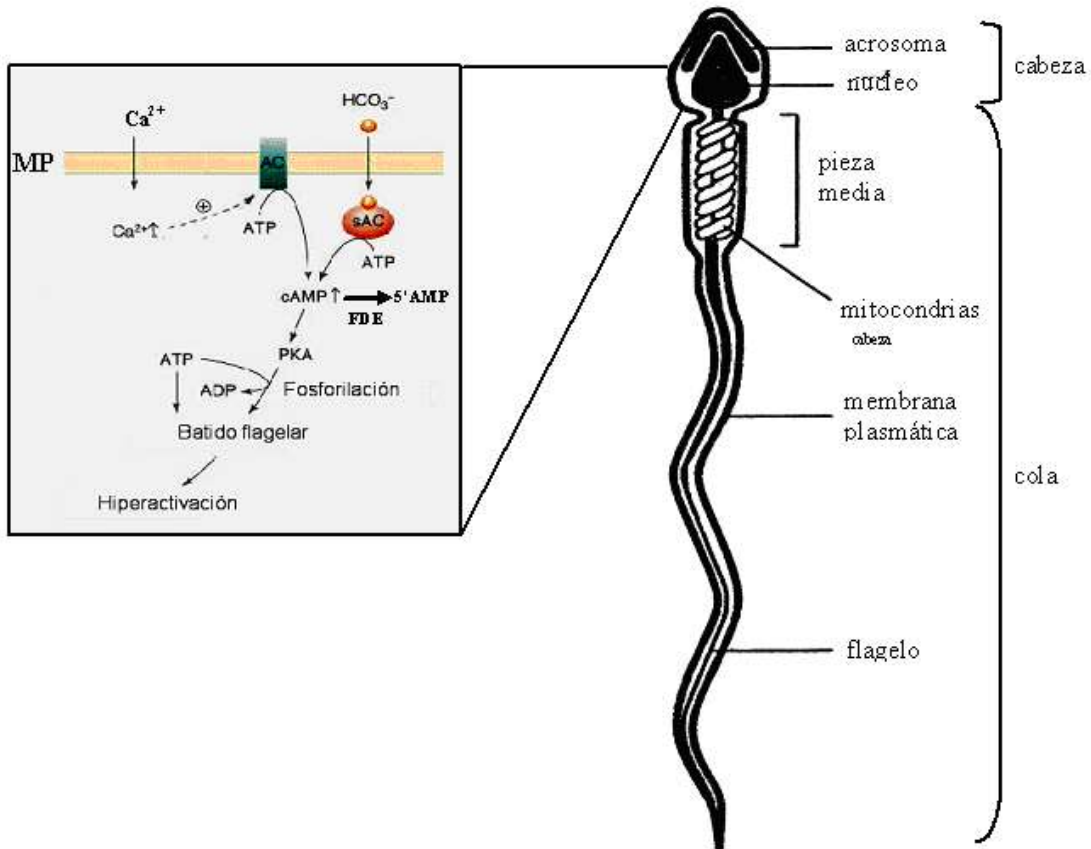
MEDIDAS DE PREVENCIÓN: Todos los alumnos deberán utilizar guantes, guardapolvos y haber sido vacunados contra la hepatitis B.

FLAGELOS

El espermatozoide es una célula altamente especializada para propagar los genes paternos. Para ello consta principalmente de una cabeza y de una cola (ver esquema). La cabeza está constituida por el núcleo, el acrosoma, algunas estructuras del citoesqueleto y escaso citoplasma. El núcleo contiene el DNA haploide paterno, altamente condensado. La cola es un largo flagelo que presenta una estructura compleja donde podemos destacar el axonema y la vaina de mitocondrias. El axonema está formado por el complejo de microtúbulos en estructura 9+2 que se extiende a lo largo del flagelo. Los pares periféricos de microtúbulos se contactan transitoriamente entre si por medio de varias moléculas de dineína. Esta es una proteína motora con actividad ATPasa que por medio de la hidrólisis de ATP participa en el movimiento flagelar. El ATP proviene de las mitocondrias presentes en la pieza media del espermatozoide. De este modo se genera la fuerza motriz necesaria para que el espermatozoide alcance el óvulo y lo fecunde.

A diferencia de los animales inferiores, los espermatozoides de mamíferos eyaculados deben sufrir un proceso de maduración para fertilizar un ovocito. Los espermatozoides llegan a estar "competentes para la fertilización" luego de residir en el tracto reproductivo de la hembra durante un periodo en el cual sufren una serie de cambios fisiológicos conocidos como **capacitación**. Se ha referido a la capacitación como el cambio que habilita al espermatozoide para sufrir la **reacción acrosomal** y la **hiperactivación**. La capacitación ha sido relacionada con cambios en la concentración espermática de iones intracelulares, la fluidez de la membrana plasmática, el metabolismo y la motilidad. La hiperactivación es crítica para el proceso de fertilización porque le permite al espermatozoide moverse en el lumen del oviducto, atravesar barreras mucosas y finalmente penetrar la zona pelúcida del ovocito.

Varios factores han sido relacionados con la hiperactivación tal como Ca, ATP, AMPc y bicarbonato y varios otros componentes del tracto reproductivo de la hembra. Un incremento de calcio intracelular estimula la adenilato ciclasa (AC) resultando en un incremento transitorio del AMP cíclico intracelular (AMPc). El AMPc estimula proteína quinasa A (PKA) la cual luego activa tirosina quinasa que fosforila residuos de tirosina de proteínas del axonema. Esta fosforilación permite que los pares vecinos de microtúbulos del axonema se deslicen entre si y se curvan produciendo el movimiento flagelar que impulsa al espermatozoide. Este fenómeno es regulado por disminución de la concentración de cAMP por la fosfodiesterasa que lo degrada a adenosin monofosfato (AMP).



OBJETIVOS:

- 1-Observar el movimiento flagelar en espermatozoides.
- 2-Observar el efecto de distintos agentes sobre la motilidad flagelar en espermatozoides humanos.

MATERIALES:

- | | |
|-------------------------------|------------------------|
| - Espermatozoides humanos | - Vanadato de Sodio 1M |
| - Acida Sódica 10% | - Eosina 1% |
| - Pentoxifilina 60 mM | - Agua destilada |
| - Portaobjetos y cubreobjetos | - Platina térmica |

PROCEDIMIENTO:

Durante todos los ensayos las muestras deben ser mantenidas a 37° C.

ENSAYOS CON ESPERMATOZOIDEOS:

- a) **Muestra control:** En un portaobjetos colocar 10 µl de la suspensión de espermatozoides sin tratar junto con 2 µl de eosina al 1%. Cubrir con cubreobjeto y observar la motilidad en el microscopio. Estimar el % de espermatozoides vivos y móviles
- b) **Tratamiento con Pentoxifilina:** Colocar en un portaobjetos 10 µl de la suspensión de espermatozoides y agregar 1 µl de Pentoxifilina 60 mM. En el mismo

portaobjetos colocar otros 10 μ l de la suspensión de espermatozoides sin ningún agregado. Cubrir ambas gotas con cubreobjetos y observar en el microscopio. Comparar los espermatozoides tratados con la muestra control. Estimar el % de espermatozoides hiperactivados en las muestras tratadas.

Nota: La Pentoxifilina es un inhibidor de la fosfodiesterasa, que aumenta la concentración del segundo mensajero AMP cíclico, por lo que se activan los mecanismos de transducción de señales AMP cíclico dependientes.

c) **Tratamiento hipotónico:** En un portaobjetos agregar 10 μ l de espermatozoides, 10 μ l de agua y 3 μ l de eosina al 1%. Observar al microscopio. Estimar el % de espermatozoides vivos y móviles.

d) **Tratamiento con Vanadato de sodio:** En un portaobjetos agregar 10 μ l de espermatozoides, 2 μ l de vanadato de sodio y 2 μ l de eosina al 1%. Observar al microscopio. Estimar el % de espermatozoides vivos y móviles.

Nota: El vanadato de sodio es un inhibidor de ATPasas y de fosfatasa de fosfotirosina.

e) **Tratamiento con Azida Sódica:** En un portaobjetos agregar 10 μ l de espermatozoides, 1 μ l de azida sódica al 10% y 2 μ l de eosina al 1%. Observar al microscopio. Estimar el % de espermatozoides vivos y móviles.

Nota: La Azida Sódica es un tóxico mitocondrial ya que inhibe la citocromo oxidasa.

Completar la siguiente tabla según los distintos tratamientos y su correspondencia con el tipo de motilidad (cuando la haya) y el % de espermatozoides vivos y móviles. Interpretar los resultados obtenidos.

Tratamiento	Mortalidad %	Morfología (cola)	Movimiento
Control			
Pentoxifilina			
Hipotónico			
Vanadato de sodio			
Azida sódica			

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N° 3: SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Título: Síntesis de proteínas en bacterias.

INTRODUCCION:

La síntesis proteica o traducción tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular. Los aminoácidos son transportados por el ARN de transferencia (ARNt), específico para cada uno de ellos, y son llevados hasta el ARN mensajero (ARNm), donde se aparean por complementariedad de bases entre codón (RNAm) y anticodón (RNAt). Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARNm queda libre y puede ser leído de nuevo. Es muy frecuente que antes de que finalice una proteína ya está comenzando otra, con lo cual, una misma molécula de ARNm está siendo leída por varios ribosomas simultáneamente (polirribosomas).

Tanto en células procarióticas como eucarióticas la síntesis consta de tres etapas bien diferenciadas: de iniciación, elongación y terminación. En todas estas etapas participan factores proteicos, algunos de los cuales se valen de la hidrólisis de GTP para cumplir su función.

La unión de los aminoácidos entre si para construir una proteína se produce de modo que el grupo carboxilo de una aminorácido se combina con el grupo amino del aminoácido siguiente.

OBJETIVOS

Determinar experimentalmente el efecto de diferentes antibióticos sobre el crecimiento y la síntesis de proteínas bacterianas

MÉTODOS

Se determinará el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica a 260 nm en espectrofotómetro y se analizará el perfil proteico por electroforesis en geles de poliacríamida.

MATERIALES

Se trabaja con material estéril por autoclavado o filtración.

- DH5 α : cepa de *Escherichia coli* conservada a -70° C en 15 % de glicerol (glycerol stock). Esta cepa es utilizada en Biología Molecular para reproducir plásmidos y para expresar proteínas recombinantes heterólogas.
- Medio LB: 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 r NaCl 1 ml 1N NaOH, para 1 l.
- Antibióticos (50 mg/ml): Streptomina, Kanamicina, Cloranfenicol, cicloheximida.
- PBS: buffer salino fosfato
- Reactivos para SDS-PAGE (consultar Trabajo Práctico II: Proteínas de Membranas Biológicas).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Cultivo de bacterias:

Procedimientos realizados previamente por los docentes:

- Diluir una alícuota de una suspensión de bacterias en 7 ml de medio LB en un tubo de 50 ml.
- Incubar toda la noche (ON) a 37°C a 300 rpm en agitador: **Cultivo ON**
- Diluir 3 ml de cultivo ON con 12 ml de medio LB
- Incubar 1 h a 37°C a 300 rpm en un agitador.
- Medir la Densidad Óptica (OD) a 460 nm en espectrofotómetro: 0.2 ml de cultivo + 0.8 ml LB

A partir de este punto comienzan a trabajar los alumnos en el laboratorio:

Serie A:

- Numerar 5 tubos de 1.5 ml del A1 al A5.
- Hacer alícuotas de 1 ml/tubo del cultivo bacteriano.
- Agregar 10 µl de PBS o de antibiótico por tubo (rotular los tubos):

Tubo A 1: sin antibiótico

Tubo A 2: estreptomina

Tubo A 3: kanamicina

Tubo A 4: cloranfenicol

Tubo A 5: cicloheximida

- Incubar 20 min a 37°C a 300 rpm en un agitador.

Serie B:

- Numerar 5 tubos de 1.5 ml del B1 al B5.
- Hacer alícuotas de 1 ml/tubo del cultivo bacteriano.

Tubo B 1: sin antibiótico

Tubo B 2: estreptomina

Tubo B 3: kanamicina

Tubo B 4: cloranfenicol

Tubo B 5: cicloheximida

- Incubar 60 min a 37°C a 300 rpm en un agitador.

De cada muestra de la Series A y B:

- 1- Tomar una alícuota de 0,2 ml y agregarle 0,8 ml de LB. Estimar el crecimiento bacteriano por turbidimetría (DO) a 460 nm en espectrofotómetro.
- 2- Centrifugar los 800 µl de cultivo Experimental restantes durante 10 min a 12000 x g (aproximadamente 12000 rpm).
- 3- Resuspender el sedimento bacteriano con 50 µl de PBS.
- 4- Adicionar 20 µl de sample buffer sin DTT.
- 5- Incubar las muestras a 95°C durante 5 min.

- 6- Centrifugar 10 min a 12000 x g
- 7- Transferir sobrenadante a tubo de 1.5 ml.
- 8- Agregar 1.5 μ l de DTT (0.5 M).
- 9- Incubar las muestras a 95°C durante 5 min.
- 10- Analizar (15 o 30 μ l) las muestras por SDS-PAGE.

INTERPRETACION Y CONCLUSIONES. Se observará el gel y se deducirá si existen cambios en el perfil y/o intensidad de las bandas de proteínas obtenidas de bacterias tratadas con diferentes antibióticos. Se determinara si se producen cambios en el crecimiento bacteriano por el tratamiento con diferentes antibióticos.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N° 4: DIVISION CELULAR: MITOSIS

CONTENIDOS

División celular. Mitosis. Descripción general de la Mitosis. Características de cada fase. Organización molecular y papel funcional del huso mitótico. Citocinesis en células animales y vegetales.

OBJETIVOS

Una vez que haya completado las actividades el alumno debería ser capaz de:

1. Describir cómo se reproducen las células
2. Explicar cómo se copian y distribuyen los cromosomas a cada célula hija
3. Describir el mecanismo por el cual se conserva el material hereditario y describir cual es su fin.
4. Definir y usar correctamente los siguientes términos: alelo, anafase, replicación de cromosomas, citocinesis, diploide, haploide, síntesis de ADN, gen, cromosoma homólogo, interfase, ciclo celular, metafase, mitosis, prometafase, profase, cromosomas replicados, cromátidas hermanas, fibras del huso, telofase, cromosomas no replicados, centrómero, cinetocoro.

INTRODUCCION

¿Qué es mitosis?

Mitosis es la división nuclear más citocinesis, y produce dos células hijas idénticas durante la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La interfase frecuentemente se incluye en discusiones sobre mitosis, pero la interfase técnicamente no es parte de la mitosis, más bien incluye las etapas G1, S y G2 del ciclo celular.

Interfase : La célula está ocupada en la actividad metabólica preparándose para la mitosis (las próximas cuatro fases que conducen e incluyen la división nuclear). Los cromosomas no se disciernen claramente en el núcleo, aunque una mancha oscura llamada nucléolo, puede ser visible. La célula puede contener un par de centriolos (o

centros de organización de microtúbulos en los vegetales) los cuales son sitios de organización para los microtúbulos.

Profase: La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible en el microscopio óptico como cromosomas. El nucléolo desaparece. Los centriolos comienzan a moverse a polos opuestos de la célula y fibras se extienden desde los centrómeros. Algunas fibras cruzan la célula para formar el huso mitótico.

Prometáfase: La membrana nuclear se disuelve, marcando el comienzo de la prometáfase. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros. Los microtúbulos se adhieren a los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse.

Metafase: Fibras del huso alinean los cromosomas a lo largo del medio del núcleo celular. Esta línea es referida como, el plato de la metafase. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.

Anafase: Los pares de cromosomas se separan en los cinetocoros y se mueven a lados opuestos de la célula. El movimiento es el resultado de una combinación de: el movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtúbulos del huso y la interacción física de los microtúbulos polares.

Telofase: Las cromátidas llegan a los polos opuestos de la célula, y nuevas membranas se forman alrededor de los núcleos hijos. Los cromosomas se dispersan y ya no son visibles bajo el microscopio óptico. Las fibras del huso se dispersan, y la citocinesis o la partición de la célula puede comenzar también durante esta etapa.

Citocinesis: En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, alrededor del centro de la célula se contrae pellizcando la célula en dos células hijas, cada una con su núcleo. En células vegetales, la pared rígida requiere que una placa celular sea sintetizada entre las dos células hijas.

Actividad N°1

Descripción de las distintas etapas de la mitosis (tiempo sugerido: 20 minutos)

Se observará un vídeo obtenido a partir de una fuente de Internet, donde se observan las distintas etapas durante la división de una célula por mitosis.

Actividad N°2 (tiempo sugerido: 20 minutos)

Descripción de la distribución del material genético durante la división mitótica

Se realizará un juego interactivo obtenido de una fuente de Internet, donde se describe el proceso de distribución del material genético

Actividad N°3 (tiempo sugerido: 40 minutos)

Observación microscópica de mitosis en células de raíz de cebolla, ajo o lentejas.

FUNDAMENTO: El proceso de reproducción celular conocido con el nombre de mitosis, puede ser estudiado eligiendo un material constituido por células que se hallen en continua división. Esta condición la reúnen los meristemas terminales o primarios, tales como los que se encuentran en el ápice de las raíces.

MATERIALES

- * Microscopio
- * Portaobjetos
- * Cubreobjetos
- * hojas de bisturí estéril
- * Aguja introducida en un mango.
- * Pinzas
- * Palillos
- * Frasco lavador
- * Baño termostático
- * Tijeras
- * Papel de filtro
- * Vaso de precipitación
- * Vidrio de reloj
- Orceína Acética-dorhídrica (orceína 0.2%, acético 50%, Clorhídrico 10%)

PROCEDIMIENTO

- 1 Llenar un vaso de precipitación con agua y colocar un bulbo de cebolla sujeto con dos o tres palillos de manera que la parte inferior quede inmersa en el agua.. Al cabo de 3-4 días aparecerán numerosas raicillas en crecimiento de unos 3 o 4 cm de longitud. Este material será provisto por el docente.
- 2 Cortar con tijeras finas o cuchilla de afeitar, los 10 últimos milímetros de las raicillas.
- 3 Para colorear las raíces, dentro de un tubo tipo eppendorff cubrir las raicillas con aprox. 500uL de orceína acética clorhídrica. Dejar que actué el colorante durante 3-5 minutos en un baño a 70 °C.
- 4 Con las pinzas finas tomar con cuidado una raíz y colocarla sobre un portaobjetos, cortar los últimos 2 ó 3 milímetros y desechar el resto.
- 5 Colocar el cubre-objetos y encima una almohadilla hecha con papel toalla sobre la que se ejerce presión con el dedo pulgar, primero suave, después más intensa, para aplastar la muestra, técnica conocida como squash
- 6 Aspirar con el papel de filtro o toalla de papel el exceso de colorante.
- 7 Observar al microscopio primero a menor aumento y luego con aumentos mayores, recorriendo diversos campos para descubrir en las células observadas las distintas fases de la mitosis.

Nota: La preparación presenta el aspecto de una dispersión de células por todo el campo que abarca el microscopio. Se observarán células en distintas fases o estados de división celular. Con esta técnica de tinción se ven los cromosomas impregnados por la orceína en color morado. El aspecto reticulado, así como el mayor tamaño de algunos núcleos, corresponde a las células que se encuentran en los procesos iniciales de la división.

Realice las siguientes actividades:

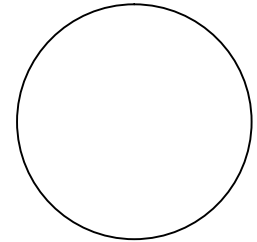
- Observe en el preparado a mediano aumento, al menos 100 células y vaya contándolas, de estas células lleve un registro de cuantas de ellas se encuentran

en alguna etapa de división mitótica. Con estos datos determine el índice mitótico (IM): número mitosis/ número total de células.

- Realice esquemas de cada fase preferiblemente en el mayor aumento (en 100X recuerde usar aceite de inmersión y limpiar luego el lente).

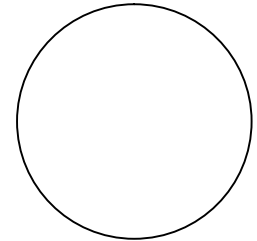
Interfase:

- Forma, tamaño y apariencia del núcleo.
- Membrana nuclear.
- Número, tamaño y forma de nucléolos



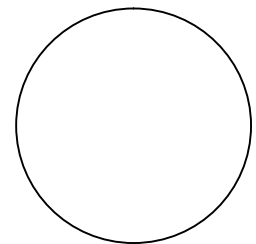
Profase:

- Membrana nuclear
- Aspecto mas contraído del material teñido.
- Estructura doble de los cromosomas
- Nucléolos (en profase temprana).



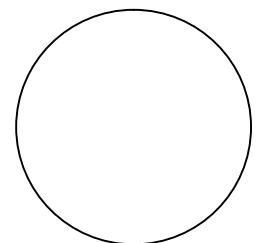
Metafase:

- Orientación de los centrómeros y formación de la placa ecuatorial.
- Detalles sobre el número y la morfología de los cromosomas que pueda apreciar.



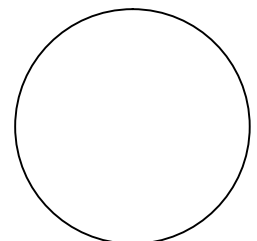
Anafase:

- Estructura simple de los cromosomas
- Posición de los brazos cromosómicos.
- Marcha hacia los polos.



Telofase:

- Agrupación densa de los cromosomas en los polos
- Desenrollamiento de los mismos
- Aparición del tabique entre los núcleos recién formados.



BIBLIOGRAFÍA

BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CELULA Alberts, B., D. Bray, J Lewis, M. Raff, K Roberts y J. Watson. Ediciones Omega SA. Barcelona. 1996.

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR De Robertis, E., De Robertis, E.M. Editorial El Ateneo. Buenos Aires 1998.

Internet:

URL:http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/cell_cycle/MitosisFlash.html

URL: http://www.biologyinmotion.com/cell_division/index.html

GUIA DE ESTUDIO

- 1 Define y diferencia reproducción sexual y asexual. Explica las ventajas e inconvenientes de cada una.
- 2 ¿Cómo se modifica la cromatina cuando el núcleo entra en división?
- 1 Da las características morfológicas de los cromosomas metafásicos y señala sobre el mismo: cromátida, centrómero, brazo.
- 2 Define mitosis, explica su resultado y su importancia biológica. ¿Que tipo de células realiza mitosis? Ahora haz lo mismo con la meiosis. ¿Observas alguna diferencia?
- 3 En la especie humana, pon ejemplos de células haploides y diploides. Indica el n° de cromosomas de cada una de ellas.
- 4 ¿Que relación guardan la mitosis y la meiosis con la reproducción sexual y asexual?
- 5 ¿Que diferencias existen entre Anafase I y Anafase II y Telofase I y Telofase II?
- 6 ¿En que momento de la meiosis se reduce el numero de cromosomas?
- 7 ¿En que difiere la meiosis I de la meiosis II con respecto a la unión de los cromosomas a las fibras del huso?
- 8 ¿Que significado biológico tiene la gametogénesis y que diferencias encuentra entre los sexos femeninos y masculinos?
- 9 Una célula haploide tiene cromosomas homólogos. ¿Porque?
- 10 ¿Cual es la fase mas prolongada de la meiosis? Describa sus etapas.
- 11 Las células del perro tienen 78 cromosomas. ¿Cuantos pares de cromosomas tiene una célula obtenida por mitosis? ¿Y por meiosis?
- 12 ¿Que función tiene el factor promotor de la mitosis?
- 13 ¿Que relación existe entre las fosfatasa, la envoltura nuclear y la citocinesis?
- 14 ¿Cuales son los componentes del huso mitótico? ¿Que función cumplen sus principales componentes?
- 15 Describa sintéticamente las fases de la mitosis
- 16 Describa sintéticamente las fases de la meiosis.

17 Complete el siguiente cuadro introduciendo en las columnas 2, 3 y 4 las palabras claves de la columna 5 según corresponda.

CARACTERÍSTICAS	MITOSIS	MEIOSIS I	MEIOSIS II	PALABRAS CLAVE
1. Se inicia en una célula con un número de juegos cromosómicos				- Haploide - Diploide - Haploide o diploide
2. En animales se inicia en células				- Precursoras de gametas - Somáticas - De cualquier tipo
3. En profase, los cromosomas homólogos se condensan...				- Apareados - Individualmente
4. Se produce intercambio entre cromátidas homologas.				- Si - No
5. En metafase el número de cromátidas asociadas en el plano ecuatorial es de...				- 1 - 2 - 4
- 6. Durante la anafase se separan y migran hacia los polos...	-	-	-	- cromátidas hermanas - cromátidas recombinadas - cromosomas homólogos
- 7. En la anafase el número de cromátidas de cada cromosoma es de...	-	-	-	- 1 - 2 - 4
- 8. Es una división de tipo	-	-	-	- Reduccional - Ecuacional
- 9. Da como resultado células hijas	-	-	-	- Distintas de la madre - Idénticas a la madre
- 10. Puede intervenir en la reproducción	-	-	-	- Sexual - Asexual

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N° 5: INTRODUCCIÓN A LA HISTOLOGÍA I

Objetivos:

- Conocer las técnicas histológicas para la observación de preparados en microscopio óptico.
- Observar preparados de Tejidos epitelial y conectivo

Los preparados histológicos son cortes de tejido de aproximadamente 5-10 micrómetros de grosor montados en un portaobjeto y teñidos con un colorante que realza algunos componentes celulares e intercelulares.

El objetivo de este protocolo es:

- fijar un trozo de tejido
- cortarlo en un micrótomo
- teñir los cortes

Para poder cortarlo el tejido debe ser “endurecido” y para ello se usa parafina. Como la parafina no es soluble en el agua contenida en el tejido, se agrega un paso de deshidratación antes de la inclusión en parafina.

Luego de cortar el trozo de tejido en el micrótomo los cortes quedan incluidos en la parafina, que no permitiría el ingreso de los colorantes acuosos. Por eso también se agregan los pasos previos de desparafinización y rehidratación de los cortes.

Por último, los cortes ya teñidos con los colorantes deben ser montados entre el porta y el cubreobjeto, pero como el medio de montaje es inmiscible en agua, nuevamente se agrega un paso previo de deshidratación de los cortes.

Finalmente, nos queda el protocolo completo:

- fijar un trozo de tejido
- **deshidrarlo** e incluirlo en parafina
- cortarlo en un micrótomo
- desparafinizar y **rehidratar** los cortes
- teñir los cortes
- **deshidratarlos** y realizar el montaje

Se siguen estos pasos:

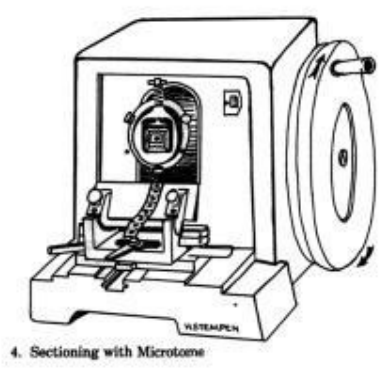
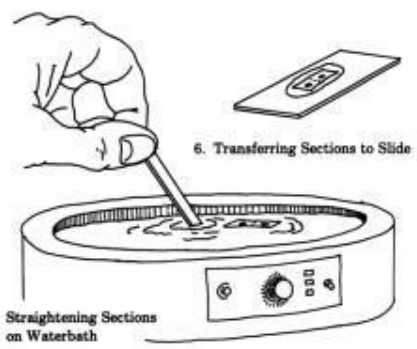
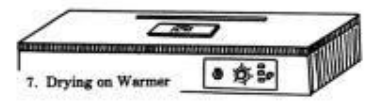
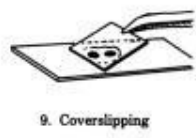
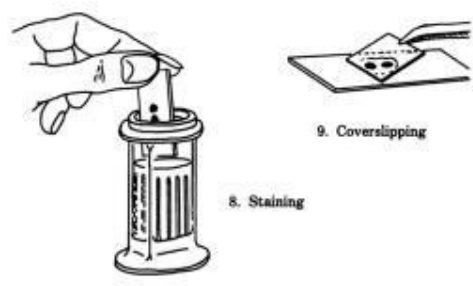
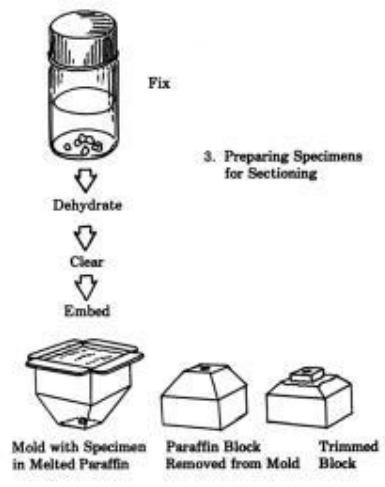
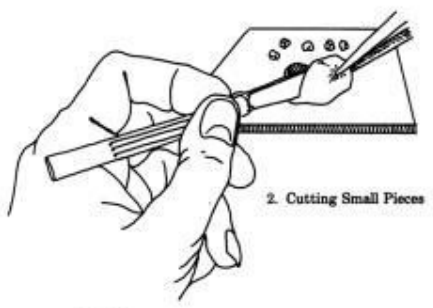
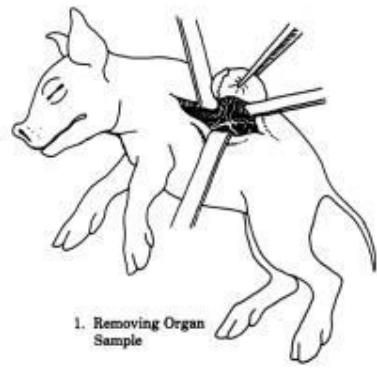
- 1) remoción del tejido del animal
- 2) fijación: se sumerge el trozo de tejido en **formol 10%** por lo menos durante 6 hs. Se pretende preservar la morfología normal con este paso.
- 3) deshidratación en un gradiente creciente de alcoholes hasta alcohol absoluto. Por ej. Etanol 70%, 96%, 96%, 100% y 100%, con un hora en cada solución.
- 4) Aclarado: se sumerge el trozo de tejido en un solvente intermedio, como **xilol**, que es miscible en alcohol y en la parafina. Se usa xilol 50% en etanol absoluto durante 1 hora, y luego xilol 100% 1 hora.

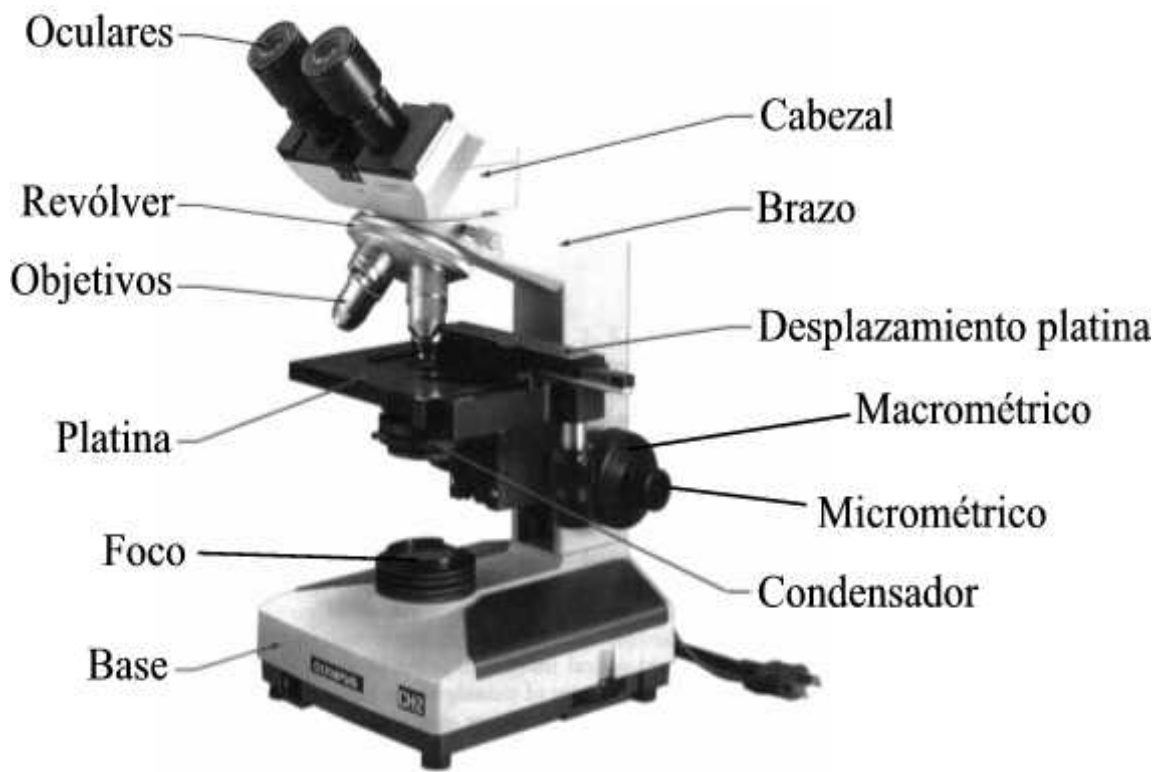
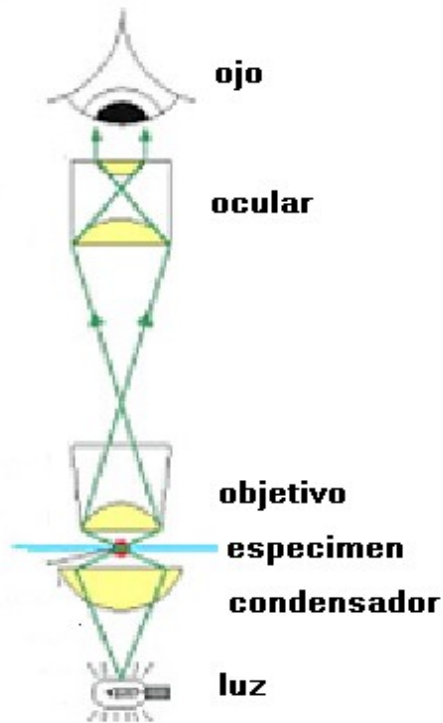
- 5) infiltración en **parafina** líquida (a 52-56°, fundida en estufa): gradualmente va reemplazando al xilol.
- 6) Se transfiere el trozo de tejido un molde adecuado con parafina nueva fundida y se deja solidificar. Se obtiene un **taco** (según el micrótomos, a veces hay que pegarlo sobre un soporte)
- 7) Tallado del taco
- 8) Corte en **micrótomos**: las secciones se dejan flotar en agua caliente (45°C) para estirarlas y se montan en un portaobjeto.
- 9) El portaobjeto se deja secar SIN DISOLVER LA PARAFINA sobre un **plato caliente** para fijar las secciones al vidrio.
- 10) Desparafinización de las secciones en xilol en la estufa a 58°C por 15 min. Hay que eliminar la parafina que impide la coloración.
- 11) Ya sin parafina, hay que rehidratar las secciones ya que los colorantes son acuosos. Para ello se usa un gradiente decreciente de alcoholes hasta agua pura. Llamamos **tren** a una serie de vasos coplin con agua, etanol 50%, 70%, 96%, 100% y xilol, que se usa en ambos sentidos, para hidratar o deshidratar. Se dejan los preparados 1 minuto en cada vaso
- 12) Contraste, en general con **hematoxilina y eosina**. Se dejan los preparados 1- 2 minutos en hematoxilina, luego se viran del color rojo vino a azul-violeta en agua corriente por 2 minutos (con esto se neutraliza la acidez del colorante) y finalmente se tratan con eosina por 30 segundos.
- 13) Deshidratación de las secciones (nuevamente en el tren, pero en sentido inverso)
- 14) aclarado en xilol, que es miscible en el líquido de montaje
- 15) Montaje del cubreobjeto con una gota de bálsamo de Canadá o resina sintética (DPX)

Hematoxilina: es un colorante natural de origen vegetal. Debe ser unida a una sal metálica como mordiente para formar una laca de carga positiva, por eso es un colorante básico o catiónico que confiere un color púrpura a las sustancias con carga negativa o ácidas. Así se tiñen los núcleos celulares, el retículo endoplasmático rugoso y matriz del cartílago de color azul. Las estructuras que se tiñen con los colorantes básicos se denominan **basófilas**.

Otros colorantes básicos son el azul de toluidina, el azul de metileno y fucsina básica.

Existen otros colorantes que no necesitan de un mordiente y conservan su carga negativa. Son los ácidos o aniónicos. Reaccionan electrostáticamente con estructuras de carga positiva, denominadas entonces **acidófilas**. Es el caso de la **eosina**, un colorante artificial que otorga color naranja o rojo al citoplasma y fibras colágenas. Otros colorantes ácidos son el naranja G y azul de anilina.





óptico

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

**TPL N° 6. TEJIDO ESPECIALIZADO: EPITELIO GERMINAL DEL
TESTICULO. MEIOSIS**

CONTENIDOS

Espermatogénesis en mamíferos. Meiosis: importancia biológica. Fases de la meiosis.

OBJETIVOS

1. Describir la división de una célula por meiosis.
2. Explicar el proceso de distribución del material genético durante la meiosis.
3. Observar preparados de testículo de rata macho adulta (Espermatogénesis).

INTRODUCCION

¿Qué es meiosis?

La Meiosis es el proceso por el cual se convierte una célula diploide en un gameto haploide, y causa un cambio en la información genética para incrementar la diversidad de los descendientes.

En meiosis I, los cromosomas homólogos de una célula diploide se segregan, produciendo células hijas haploides. Este es el paso de la meiosis que genera diversidad genética

Profase I: La replicación del ADN precede el comienzo de la meiosis I. Durante la profase I, los cromosomas homólogos se aparean y forman sinapsis, un paso que es único a la meiosis. Los cromosomas apareados se llaman bivalentes, y la formación de quiasmas causada por recombinación genética se vuelve aparente. La condensación de los cromosomas permite que estos sean vistos en el microscopio. Note que el bivalente tiene dos cromosomas y cuatro cromátides, con un cromosoma de cada padre.

Prometafase I: La membrana nuclear desaparece. Un cinetocoro se forma por cada cromosoma, no uno por cada cromátida, y los cromosomas adosados a fibras del huso comienzan a moverse.

Metafase I: Bivalentes, cada uno compuesto de dos cromosomas (cuatro cromátides) se alinean en el plato de metafase. La orientación es al azar, con cada homólogo paterno en un lado. Esto quiere decir que hay un 50% de posibilidad de que las células hijas reciban el homólogo del padre o de la madre por cada cromosoma.

Anafase I: Los quiasmas se separan. Los cromosomas, cada uno con dos cromátides, se mueven a polos opuestos. Cada una de las células hijas ahora es haploide (23 cromosomas), pero cada cromosoma tiene dos cromátides.

Telofase I: Las envolturas nucleares se pueden reformar, o la célula puede comenzar rápidamente meiosis II.

Citocinesis: Análoga a la mitosis donde dos células hijas completas se forman.

La meiosis II es similar a la mitosis. Sin embargo no hay fase "S". Las cromátides de cada cromosoma ya no son idénticas en razón de la recombinación. La meiosis II separa las cromátides produciendo dos células hijas, cada una con 23 cromosomas (haploide), y cada cromosoma tiene solamente una cromátide.

Actividad N°1

Descripción de las distintas etapas de la meiosis (tiempo sugerido: 20 minutos)

Se observará un vídeo obtenido a partir de una fuente de Internet, donde se observan las distintas etapas durante la división de una célula por meiosis.

Actividad N°2 (tiempo sugerido: 20 minutos)

Descripción de la distribución del material genético durante la división meiótica

Se realizará un juego interactivo obtenido de una fuente de Internet, donde se describe el proceso de distribución del material genético.

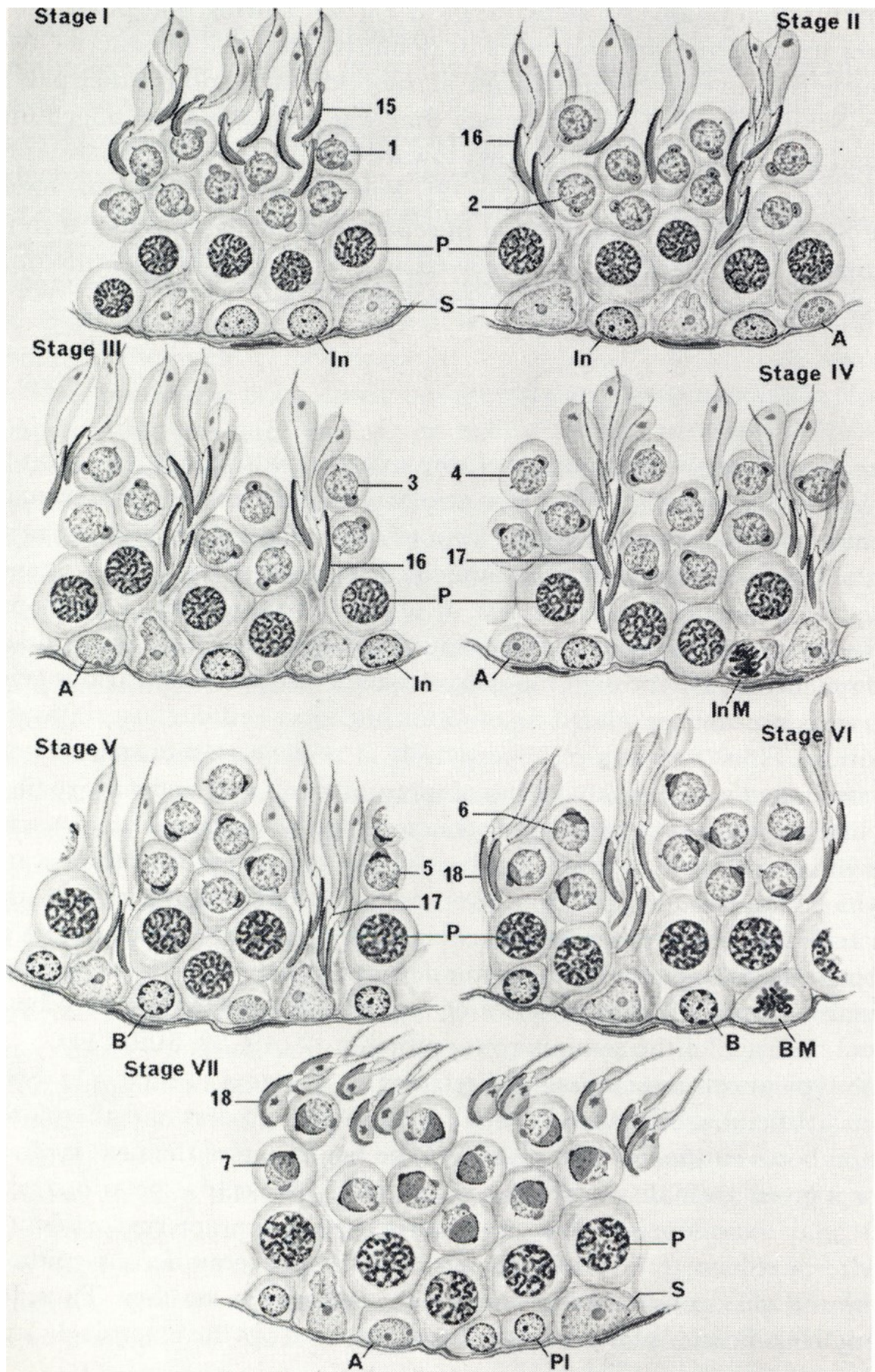
Actividad N°3 (tiempo sugerido: 60-90 minutos)

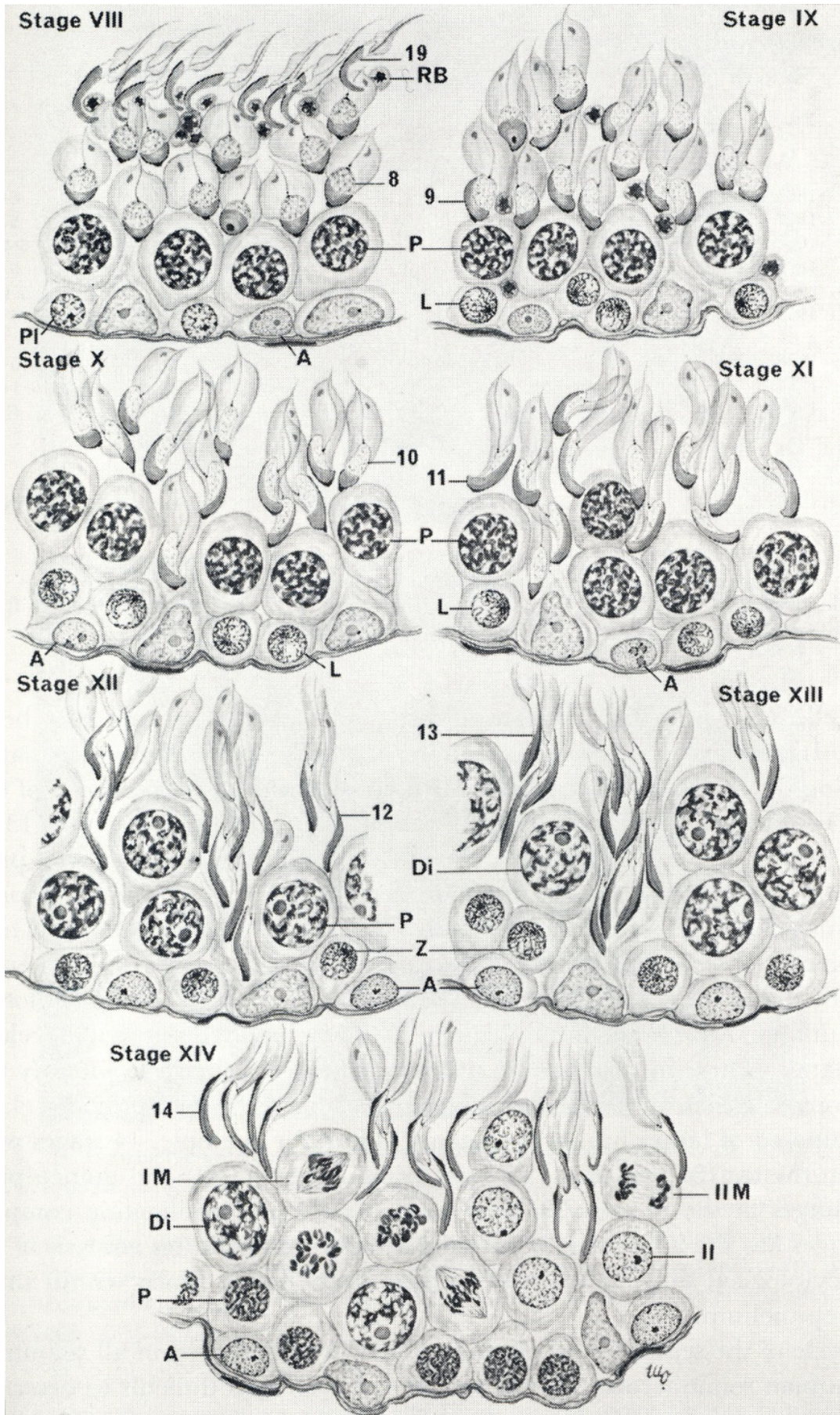
Espermatogénesis

- Se introducirán conceptos básicos del aparato reproductor masculino y del epitelio del túbulo seminífero en mamíferos.
- Se distinguirán los diferentes estadios de la espermatogénesis en cortes de testículo de rata adulta.

Materiales:

- Microscopio óptico.
- Cortes de testículo de rata adulta. Cortes de tejido de aproximadamente 5-10 micrómetros de grosor montados en un portaobjeto y teñidos con hematoxilina-eosina.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CURSO DE BIOLOGIA CELULAR - 2020

TPL N° 7: INTRODUCCIÓN A LA HISTOLOGÍA II

Objetivo:

- Observar preparados de Tejidos muscular y nervioso
- Conocer las técnicas convencionales de preparación de un tejido para su estudio en el microscopio electrónico de transmisión (MET).

En el microscopio electrónico de transmisión colocamos una sección de tejido de aproximadamente 70 nm (**nanometros**) apoyada sobre una **grilla** o rejilla de cobre de 3 mm de diámetro. Para poder cortar así el tejido debemos incluir el trozo en una resina dura, y para ello debimos previamente fijarlo y deshidratarlo, ya que la resina es inmisible en el agua del tejido. Seguimos estos pasos:

- 1) Remoción del tejido del animal. La muestra se corta en trocitos de 1mm³.
- 2) Fijación I para las proteínas. Se sumergen los trocitos en **glutaraldehído** 5% en **buffer fosfato** 0.1 M durante 1-2 hs.
- 3) Lavado en ese buffer
- 4) Fijación II para los fosfolípidos. Se sumergen los trocitos en **tretróxido de osmio** al 1% aq. durante 1 h.
- 5) Lavado en ese mismo buffer
- 6) Deshidratación en un gradiente creciente de acetona, 50%, 70%, 90%, 100% y 100% , con 15 minutos cada cambio.
- 7) Inclusión en una resina sintética viscosa, del tipo **epóxido**, que es miscible en la acetona, durante un día.
- 8) Entacado: se colocan los trozos de tejido infiltrados en la resina en un molde apropiado cuidando su orientación.
- 9) Polimerización en la estufa a 70°C durante 1-2 días. Se obtienen los **tacos** de resina sólida y transparente.
- 10) Se cortan secciones ultrafinas en un ultramicrotomo con cuchilla de vidrio partido o diamante. Las secciones flotan sobre el agua del **bote de la cuchilla** y se recogen con una grilla de cobre.
- 11) Contraste: debido a que el material biológico contiene átomos livianos que no ofrecen freno al paso de los electrones del microscopio, se usan metales pesados que se depositan específicamente sobre determinadas estructuras celulares y permiten identificarlas. Las grillas con los cortes de tejido se tratan con una solución de **cittrato de plomo** que se adsorbe sobre las membranas de las células, y luego con **acetato de uranilo** que realza los ácidos nucleicos.
- 12) Una vez secas, las grillas se pueden observar en el microscopio electrónico, en nuestro caso el Zeiss 902.

filamento y cápsula

ánodo

apertura de condensadora

lente condensadora

grilla con la muestra

lente objetivo

apertura de objetivo

lente intermedia

lente proyectora

pantalla

