




MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO BIOLOGÍA CELULAR

Francisco Martínez Pérez
Editor



**Escuela de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Industrial de Santander
Bucaramanga, 2017**



Manual de Prácticas de Laboratorio Biología Celular

Francisco José Martínez Pérez
Editor

**Escuela de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Industrial de Santander
Bucaramanga, 2017**

Manual de Prácticas de Laboratorio:
Biología Celular
Escuela de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Industrial de Santander

Francisco José Martínez Pérez
Profesor de la Escuela de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad Industrial de Santander

Decano de la Facultad de Ciencias:

David Miranda Mercado

Directora de Escuela de Biología:

María Isabel Criales Hernández

Asesoría pedagógica:

Esperanza Revelo Jiménez -Cededuis

Diseño gráfico, organización y estructura:

Virginia Gavilán Díaz –Cededuis

Blanca Inés Arboleda González -Cededuis

Primera edición, 2017

INTRODUCCIÓN

La Biología Celular es la rama de la Biología que estudia todos los elementos que componen a las células. Entendiendo la célula como la unidad fundamental de la vida que tiene la capacidad de crecer, reproducirse y generar su propia muerte. Las células pueden estar: en forma única, en agregados o formando colonias u órganos, los cuales en el caso de muchos hongos, plantas y animales pluricelulares forman sistemas.

El estudio de las células se soporta en diferentes procedimientos metodológicos de laboratorio que se fundamentan en reacciones químicas con sus moléculas y sus características físicas; con ello se ha logrado conocer sus componentes y los procesos que realizan. Desde esta perspectiva el presente Manual de Técnicas de Biología Celular para la Asignatura de Biología Celular de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander tiene como directriz lo estipulado en el plan de estudios de la Escuela de Biología. Su principal objetivo es introducir a los estudiantes o usuarios interesados en brindarles una serie de fundamentos básicos que les permitirá comprender una pequeña parte del fascinante e increíble mundo de la Biología Celular.

El manual consta de ocho prácticas y cuatro Anexos. La primera está dividida en dos partes con el fin de aprender las características de los reactivos químicos que tiñen a las células. La segunda práctica con título fraccionamiento celular también está dividida dos partes en la primera se resalta la importancia del rompimiento de la célula o tejidos para la obtención de organelos, mientras que la segunda da las bases del

fundamento de la centrifugación como una de las técnicas universales para la obtención de metabolitos, células y sus organelos. En tanto que la tercera está enfocada la importancia de las membranas, de ella, se resaltan las propiedades de difusión de ellas. En tanto que la cuarta práctica corresponde a la importancia de la cromatografía mediante la separación de moléculas que dan el color en las células vegetales.

Las tres prácticas siguientes (5, 6 y 7) se enfocan en la obtención y purificación de núcleos, mitocondrias y cloroplastos. Finalmente la octava práctica muestra la importancia de la mitosis en las células a través del experimento clásico con bulbos de raíz de cebolla aplicado también a raíces de ajo y haba.

En la parte final del manual se encuentran los Anexos relacionados a la seguridad en el laboratorio, la Microscopía, lisis celular y los lineamientos para la elaboración de los informes del laboratorio acorde a lo establecido al programa de estudios de la asignatura en la Escuela de Biología.

Finalmente, el autor agradece al estudiante Iván Yesid López Ardila, a la Biol. Katarina Almeida Osorio, a la Dra. Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez, a la profesora Esperanza Revelo y a las profesionales Blanca Inés Arboleda González y Virginia Gavilán Díaz del CEDEDUIS sus observaciones, comentarios y edición a cada una de las prácticas de este manual, para todos ellos todo mi agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

CAPITULO 1

PRÁCTICA 1. CONDUCTA DE ENTRADA: CONCEPTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.

- 1.1 Introducción
- 1.2. Competencias.
- 1.3. Materiales y reactivos para la práctica.
- 1.4. Desarrollo de la primera parte de la práctica (Parte A).
 - 1.4.1. Preguntas para foro de discusión
 - 1.4.2. Procedimiento de laboratorio.
 - 1.4.3 Desarrollo de la segunda parte de la práctica (Parte B).
 - 1.4.4 Resultados Esperados.
- 1.5. Informe de la práctica.
- 1.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 2

PRÁCTICA 2. FRACCIONAMIENTO CELULAR (PARTE A), LISIS CELULAR

- 2.1. Introducción.
- 2.2. Competencias.
- 2.3. Materiales y reactivos para la práctica.

2.4. Desarrollo de la primera parte de la práctica (Parte A).

2.4.1. Preguntas para foro de discusión.

2.4.2. Procedimiento de laboratorio.

2.4.2.1. Fraccionamiento con Mortero.

2.4.2.2. Fraccionamiento con cuchillas mediante procesador de alimentos.

2.4.3. Resultados esperados.

2.5. Informe de la práctica.

2.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 3

PRÁCTICA 2. FRACCIONAMIENTO CELULAR (PARTE B), CENTRIFUGACIÓN CONTINUA

3.1. Introducción.

3.2. Competencias.

3.3. Materiales y reactivos para la práctica.

3.4. Desarrollo de la primera parte de la práctica (Parte B).

3.4.1. Preguntas para foro de discusión.

3.4.2. Procedimiento de laboratorio. Centrifugación diferencial.

3.4.3. Resultados esperados.

3.5. Informe de la práctica.

3.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 4

PRÁCTICA 3. LÍPIDOS DE MEMBRANA DE CLOROPLASTOS Y PERMEABILIDAD MEMBRANAL

- 4.1. Introducción.
- 4.2. Competencias.
- 4.3. Materiales y reactivos para la práctica.
- 4.4. Desarrollo de la práctica.
 - 4.4.1. Preguntas para foro de discusión.
 - 4.4.2. Procedimiento de laboratorio.
 - 4.4.3. Resultados esperados.
- 4.5. Informe de la práctica.
- 4.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 5

PRÁCTICA 4. COMPOSICIÓN DE PIGMENTOS DE CLOROPLASTOS.

- 5.1. Introducción.
- 5.2. Competencias.
- 5.3. Materiales y reactivos para la práctica.
- 5.4. Desarrollo de la práctica.
 - 5.4.1. Preguntas para foro de discusión.

5.4.2. Procedimiento de laboratorio.

5.4.3. Resultados esperados.

5.5. Informe de la práctica.

5.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 6

PRÁCTICA 5. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS.

6.1. Introducción.

6.2. Competencias.

6.3. Materiales y reactivos para la práctica.

6.4. Desarrollo de la práctica.

6.4.1. Preguntas para foro de discusión.

6.4.2. Procedimiento de laboratorio.

6.4.3. Resultados esperados.

6.5. Informe de la práctica.

6.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 7

PRACTICA 6. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

7.1. Introducción.

7.2. Competencias.

7.3. Materiales y reactivos para la práctica.

7.4. Desarrollo de la práctica.

7.4.1. Preguntas para foro de discusión.

7.4.2. Procedimiento de laboratorio.

7.4.3. Resultados esperados.

7.5. Informe de la práctica.

7.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 8

PRÁCTICA 7. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

8.1. Introducción.

8.2. Competencias.

8.3. Materiales y reactivos para la práctica.

8.4. Desarrollo de la práctica.

8.4.1. Preguntas para foro de discusión.

8.4.2. Procedimiento de laboratorio.

8.4.3. Resultados esperados.

8.5. Informe de la práctica.

8.6. Referencias de apoyo.

CAPITULO 9

PRÁCTICA 8. MITOSIS

- 9.1. Introducción.
- 9.2. Competencias.
- 9.3. Materiales y reactivos para la práctica.
- 9.4. Desarrollo de la práctica.
 - 9.4.1. Preguntas para foro de discusión.
 - 9.4.2. Procedimiento de laboratorio.
 - 9.4.3. Resultados esperados.
- 9.5. Informe de la práctica.
- 9.6. Referencias de apoyo.

Anexo 1. Seguridad en el Laboratorio.

Anexo 2. Microscopía.

Anexo 3. Lisis celular.

Anexo 4. Lineamientos para la entrega de informes del Laboratorio de Biología Celular.

1 PRÁCTICA 1

CONDUCTA DE ENTRADA: CONCEPTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS

1.1. Introducción

Los seres vivos están conformados por células, las cuales tienen en común su composición en diferentes combinaciones de proteínas, azúcares, lípidos y ácidos nucleicos. Por esta característica, para su estudio, desde el principio de la ciencia, se han empleado sustancias que al reaccionar con algún metabolito celular se logra observar: su morfología, los componentes que la conforman o determinar los procesos que desarrolla consigo misma y/o con otras células dentro de organismos pluricelulares o unicelulares.

Por lo anterior, se han purificado, generado y/o desarrollado infinidad de sustancias también denominados reactivos químicos cuyo uso es mediante protocolos sustentados en sus propiedades. Desde esta perspectiva se pueden definir dos tipos generales de reactivos para el estudio celular, los primeros permiten generar señales químicas que pueden ser observadas y/o cuantificadas por métodos físicos, a través de equipos que cuantifican o digitalizan la señal física como son los microscopios. Ejemplo de ellos son moléculas que pueden generar un color, luz o la desintegración radioactiva de alguno de sus átomos, después de reaccionar o incorporarse con un metabolito

celular. Mientras que los otros reactivos permiten identificar y cuantificar algún producto metabólico celular y con ello es posible establecer las rutas de su biosíntesis o su participación en la fisiología y ecofisiología donde él o las especies que lo sintetizan.

Para el caso de los compuestos químicos que generan una señal luminosa o cuyos electrones reflejan fotones cuando son excitados a determinada longitud de onda, como las que se generan con microscopía, los reactivos se clasifican en: Básicos, Ácidos, Neutros e Indiferentes, algunos ejemplos de ellos se indican en la Tabla 1.

Reactivos básicos

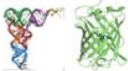
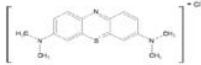
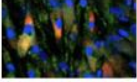
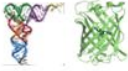
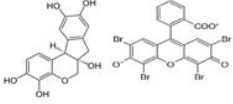
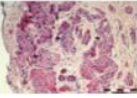

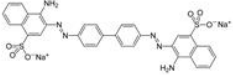


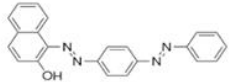
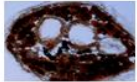
Son sales que tienen dos regiones, la parte básica aporta el color, mientras que la ácida es incolora. Dada esta característica, la región básica reaccionara preferentemente con las moléculas ácidas de la célula, siendo las principales los ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas, aminoácidos, ácidos o glicosaminoglicanos.

Por lo tanto, en células eucariontes en donde se encuentren de forma mayoritaria se logra la visualización del orgánulo que los contiene, por ejemplo: el núcleo, las mitocondrias, los cloroplastos y el ARN mensajero presente en los ribosomas. Algunos reactivos básicos son: Tionina, Safranina, Azul de toluidina, Azul de metileno y la Hematoxilina.

Reactivos Ácidos

En este tipo de reactivos, el anión es el que genera el color, en tanto que la base es incolora por ello se observan por microscopía, las estructuras celulares que incluyen proteínas compuestas de

Tabla 1. Ejemplos de Colorantes para tinciones celulares.

Biomolécula	Nombre Reactivo	Formula Química	Ejemplo	Referencia
DNA-RNA- Proteínas 	Azul de metileno			Silva ZS Jr <i>et al</i> <i>Sci Rep.</i> 2016
DNA-RNA- Proteínas 	Hematoxilina y Eosina			*Pokrywczynska <i>et al</i> <i>Arch. Immunol.</i> <i>Ther. Exp.</i> 2013
Proteínas 	Rojo Congo			Millucci <i>et al</i> <i>BB Acta</i> 2012
Membranas 	Sudan			Itakura <i>et al</i> <i>J Insect Sci.</i> 2008

aminoácidos básicos, proteínas localizadas en el citoplasma o también por el colágeno de la matriz extracelular. Ejemplos de colorantes ácidos son la fucsina ácida, naranja G o la eosina.

Reactivos Neutros

Los reactivos neutros poseen una porción ácida y otra básica; ambas con capacidad para aportar color. Por ende, reaccionan con las partes básicas y ácidas de las moléculas celulares. Esta característica permite tener una visualización general y no tan específica como los reactivos ácidos y básicos. Ejemplo, de ellos es el eosinato y el azul de metileno.

Reactivos Indiferentes

Ellos se disuelven en los componentes de la célula; no se unen a elementos celulares con compuestos mayoritariamente ácidos o básicos. Por lo tanto, se disuelven preferentemente en los lípidos o

azúcares que componen las membranas y la pared celular. Ejemplo de estos reactivos es el reactivo Sudán IV.

Todos los reactivos tienen diversas medidas de seguridad las cuales determinan su manejo, uso, aplicación, almacenamiento y desecho. Los detalles de las medidas de ellas, tipos de laboratorios para su empleo y uso, se indican en el Anexo seguridad en laboratorios. Otra ventaja que presentan los reactivos para tinciones celulares es que de acuerdo a la concentración en la que se encuentren y los tiempos de exposición con el tejido o células y las longitudes de onda con la que se excite la muestra se determina de distinta manera los componentes celulares.

Esta primera práctica se divide en dos secciones: en la primera se mostrarán las características y aplicaciones y seguridad de los reactivos para tinción en Biología Celular. Posteriormente se realizará la tinción de células musculares de pollo con los reactivos: Sudán IV, Azul de Metileno, Eosina y Rojo Congo para observar las diferencias de tinción en función de su dilución en el microscopio óptico.

En la segunda parte de esta práctica se observará en el microscopio la tinción que realizan los mismos reactivos en tejidos oculares, músculo e hígado de pollo y hojas de espinaca con la mejor dilución observada en la primera parte de la práctica.

1.2. Competencias

- Reconoce los elementos de seguridad activa y pasiva de un reactivo.

- Identifica la tinción de células musculares.
- Aprende el uso y manejo de los reactivos ácidos, básicos, neutros e indiferentes en la tinción de células musculares de pollo.
- Distingue y comprende los diferentes tipos de coloración que generan reactivos a distintas diluciones.
- Encuentra las diferencias en tinción que se observan en células animales y vegetales.

1.3. Materiales y reactivos para la práctica

- Tabla de madera cubierta con papel aluminio.
 - Micropipeta y puntas de 1000 μ l.
 - Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Láminas porta y cubre objetos.
 - Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
- **Tejidos y soluciones.**
- Hojas de espinacas, pechuga, ojo e hígado de pollo.
 - Sudan IV, Azul de Metileno, Eosina y Rojo Congo todos ellos en una dilución 1:10, 1:100 y 1:1000 en amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4) (volumen a volumen).
 - Agua desionizada.
- **Material requerido por los estudiantes**
- Bata de laboratorio.
 - Guantes.
 - Las personas con cabello largo emplear cofia.
 - Mango de bisturí con hoja o cuchilla.
 - Pinza hemostática.

1.4. Desarrollo de la primera parte de la práctica (Parte A).

1.4.1 Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

1. ¿Por qué es importante el saber el fundamento de los reactivos químicos?
2. ¿Existen algún tipo de seguridad para el manejo de reactivos químicos?
3. ¿Para qué me sirve el conocer las características de los colorantes químicos de un laboratorio de Biología Celular?
4. ¿Voy a utilizar la tinción celular en otros cursos de la Escuela de Biología?
5. ¿En mi desarrollo profesional como biólogo usare nuevamente la tinción celular?

1.4.2. Procedimiento de laboratorio

1. Presentación de los reactivos ácidos, básicos, neutros e indiferentes, sus distintas presentaciones, las características de los recipientes y la información que se tiene en las etiquetas de los mismos.
2. Reconocimiento de todos los objetos de seguridad que se encuentran en el laboratorio, tales como las salidas de emergencia del laboratorio y del edificio, la ubicación del botiquín, las canecas de basura, el lavajos, la ducha, el estante donde se guardan los equipos, entre otros.

3. Indicaciones relacionadas a las características de los reactivos Sudán IV, Azul de Metileno, Eosina y Rojo Congo que se emplearán en la práctica.
4. Suministro de tubos Eppendorf con diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 volumen a volumen en 1000 μL (micro litros) de los reactivos de tinción Sudán IV, Azul de Metileno, Eosina y Rojo Congo.
5. A partir de músculo de pollo realice cortes delgados de aproximadamente 2 cm de largo y 0.5 cm de ancho con un bisturí.
6. Coloque los cortes en cada una de las diluciones a cada uno de los reactivos e incube por 5 min a temperatura ambiente.
7. Retire la solución de cada tubo y mantener el tejido dentro de él. A este realice 3 lavados con 1 ml de agua desionizada por 3 min cada uno a temperatura ambiente.
8. Coloque en un portaobjetos cada una de las tinciones y observe al microscopio para determinar el efecto de cada tinción en las células musculares.

1.4.3. Desarrollo de la segunda parte de la práctica (Parte B)

1. Realice cortes delgados de aproximadamente 2 cm de largo y 0.5 cm de ancho con un bisturí de: ojo, hígado, y hojas de espinacas.
2. Revise los tubos Eppendorf con soluciones de los reactivos de tinción: Sudán IV, Azul de Metileno, Eosina y Rojo Congo

en una dilución 1:100, volumen a volumen en 1000 μL agua desionizada.

3. Colocar los cortes en la dilución de cada uno de los reactivos he incubar por 5 min a temperatura ambiente.
4. Retire la solución de cada tubo y mantenga el tejido dentro de él. A este, realice 3 lavados con 1 ml de agua desionizada por 3 min cada uno a temperatura ambiente.
5. Coloque cada corte en un portaobjetos y extender gentilmente para no dañarlo.
6. Observe cada una de las tinciones al microscopio.
7. Obtenga las fotografías correspondientes para observar las características de cada tinción.

1.4.4. Resultados Esperados

Se observarán diferentes niveles de tinción dependiendo de la dilución independientemente del tejido. Las estructuras que se observen en cada tinción están en función de cada tejido.

Para comparar sus resultados con los de otros autores se anexan las publicaciones correspondientes a cada reactivo las cuales están disponibles en la página del curso.

1.5. Informe de la práctica.

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (ver Anexo 4).

1.6. Referencias de apoyo.

Alzueta Zambrano J A. Histología y Citología Avanzada III. Edita e imprime FESITESS ANDALUCÍA 2011 Dirección pública de descarga: www.fatedocencia.info/3003/3003.pdf

Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. Int J Surg Pathol. 2014 Feb;22(1):12-32.

Li D, Patel AR, Klibanov AL, Kramer CM, Ruiz M, Kang BY, Mehta JL, Beller GA, Glover DK, Meyer CH. Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance. Circ Cardiovasc Imaging. 2010 Jul;3(4):464-72.

McGavin MD. Factors affecting visibility of a target tissue in histologic sections. Vet Pathol. 2014 Jan;51(1):9-27.

Megías M, Molist P, Pombal M A. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas histológicas. De uso público en la dirección <http://mmegias.webs2.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

Montalvo-Arenas CE. Técnica Histológica. Manuscrito en dirección electrónica:
histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos.../3_tecnica_histologica.pdf

Rieger J, Twardziok S, Huenigen H, Hirschberg RM, Plendl J. Porcine intestinal mast cells. Evaluation of different fixatives for histochemical

staining techniques considering tissue shrinkage. *Eur J Histochem.* 2013 Jul 30;57(3):e21.

Verbelen JP, Kerstens S. Polarization confocal microscopy and congo red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. *J Microsc.* 2000 May;198(Pt 2):101-7.

Wick MR. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. *Ann Diagn Pathol.* 2012 Jan;16(1):71-8.

2 PRÁCTICA 2A

FRACCIONAMIENTO CELULAR (PARTE A)

LISIS CELULAR

2.1. Introducción

Una de las principales características de las células eucariontes, es que muchos de sus procesos metabólicos se realizan en compartimientos denominados orgánulos como son: el núcleo, los retículos endoplásmicos rugoso y liso, el aparato de Golgi, la mitocondria, los cloroplastos, las vacuolas, los lisosomas, peroxisomas, entre otros. En este sentido los orgánulos tienen dos elementos comunes, el primero es que están compuestos por una o dos membranas, las cuales tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y la segunda es la presencia de proteínas, ácidos nucleicos, azúcares y otros metabolitos en su interior.

Ante la afirmación anterior surge la siguiente pregunta, Si todos los orgánulos tienen moléculas comunes ¿que los hacen diferentes? La respuesta, es la organización y las propiedades celulares de cada uno de ellos, las cuales determinan la forma y función de cada orgánulo en la célula. Por ejemplo, el núcleo, la mitocondria y los cloroplastos son los únicos orgánulos que tienen en común dos membranas, ácidos nucleicos y proteínas similares, pero la diferencia entre ellos es la organización de sus membranas y los procesos metabólicos que en ellos se realizan. A saber, en los tres ocurre la duplicación del ADN

y la transcripción, entre otros, pero algunas enzimas son exclusivas de la mitocondria, además la biosíntesis del ATP. Mientras que en el cloroplasto otras enzimas efectúan la fotosíntesis.

Para el estudio de la biología celular, las características moleculares, bioquímicas y formas de los diferentes orgánulos que componen a los organismos unicelulares o pluricelulares, han permitido su aislamiento y purificación a través de una metodología denominada "Fraccionamiento Subcelular o también conocido como Fraccionamiento Celular", la cual es definida como una serie de técnicas y procedimientos que permiten separar y purificar un orgánulo específico de las células para su estudio.

El fraccionamiento subcelular tiene tres componentes comunes independientemente del tipo de tejido o célula. El primero de ellos corresponde a las características químicas del medio líquido en donde se realizará el fraccionamiento, ya que los iones que lo componen influyen en la estructura de los orgánulos que se deseen obtener. La segunda es denominada disgregación o ruptura de la membrana y/o pared celular, mientras que a la tercera se le conoce como separación de cada de las fracciones celulares con base a procesos físicos como es la centrifugación o la separación por columnas de exclusión.

Para esta práctica del Laboratorio de Biología Celular se comenzará a conocer la importancia de la ruptura celular y el medio líquido en donde se realiza para la obtención de orgánulos, mientras que en la segunda parte se aplicaran los principios básicos de la centrifugación para su separación y purificación. En este sentido, para esta primera parte de la práctica se aprenderá la importancia de la lisis celular por medio de mortero y con un equipo con cuchillas denominado de manera común Picatodo. Además, se observarán los resultados de la

lisis celular cuando se emplea agua desionizada y un amortiguador con características fisiológicas como es el amortiguador fosfatos. Las diferencias entre ambos métodos y su eficiencia se pueden establecer al observar cada uno de los pasos de purificación en el microscopio óptico.

En la segunda etapa se comprenderá la importancia de la centrifugación, así como los medios líquidos en donde se coloca la muestra para la obtención y purificación de los orgánulos de células.

2.2. Competencias

- Reconoce las diferencias de lisis de tejidos por mortero y por cuchillas.
- Comprende la importancia de la ruptura mecánica de las células eucariontes.
- Aprende a estimar la eficiencia de la lisis celular por medio de la presencia de la integridad de orgánulos.
- Establece la importancia de los medios líquidos en la lisis celular.

2.3. Materiales y reactivos para la práctica

- 3 Cajas de Petri
- Mortero con pistilo.
- Probeta de 50 ml.
- Micropipeta con puntas de 20-200 μ l.
- Láminas porta y cubre objetos.
- Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.

- Procesador de alimentos.

- **Tejidos y soluciones.**
 - Hojas de espinaca.
 - Amortiguador fosfatos (HPO₄/H₃PO₄ pH 7.4)
 - Agua desionizada.

- **Material requerido por los estudiantes**
 - Bata de laboratorio.
 - Guantes.
 - Las personas que tengan cabello largo emplear cofia.
 - Tijeras de disección.

2.4. Desarrollo de la práctica.

2.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Para qué me sirve conocer el fraccionamiento subcelular?

¿La lisis celular se encuentra relacionada con la preparación de alimentos?

¿Si las cuchillas rompen todo porque se emplean instrumentos similares a una licuadora?

¿En qué voy a emplear el conocimiento del fraccionamiento subcelular en mi actividad profesional como biólogo?

2.4.2. Procedimiento de laboratorio

1. Lave cuidadosamente con agua corriente 40 hojas de espinaca y acelgas.
2. Con unas tijeras corte 10 hojas de espinaca en fragmentos pequeños reserve los fragmentos obtenidos para cada tipo de lisis.
3. Debido a que el procedimiento de esta práctica tiene procesos comunes independientemente que las variables son la solución de lisis y el procedimiento mecánico para la ruptura celular, la primera lisis se realiza con mortero, hojas de espinacas y agua desionizada (solución de lisis 1); la segunda con el mismo procedimiento, pero se emplea amortiguador fosfatos (solución de lisis 2); la tercera se realiza por medio de cuchillas, en este caso con un procesador de alimentos, empleando como solución agua desionizada y en la cuarta se emplea amortiguador fosfatos.

➤ **Fraccionamiento con Mortero**

1. Adicione 50 ml de la solución de lisis en el mortero junto con los fragmentos de hojas de espinaca.
2. Comience triturando ambos tejidos por 3 min a temperatura ambiente.
3. Coloque 100 μ l de la solución que se obtiene de la lisis en un portaobjetos y realice un frotis en un portaobjetos.
4. Posicione el portaobjetos en la platina del microscopio y fotografíe su observación con los objetivos 4X, 10X y 40 X empleando tres aberturas diferentes del diafragma y tome las fotografías correspondientes.

5. Continúe la maceración de la muestra por otros 3 min y repita los pasos 3 y 4 nuevamente.
6. Termine la maceración de la muestra por otros 3 min.
7. Repita los pasos 5 y 6 nuevamente.

➤ **Fraccionamiento con cuchillas mediante procesador de alimentos.**

1. Coloque 50 ml de la solución a emplear con la muestra que será lisada.
2. Aplique un pulso en el equipo con las cuchillas por 2 min a temperatura ambiente.
3. Coloque 100 μ l de la solución que se obtiene de la lisis en un portaobjetos y realice un frotis.
4. Posicione el portaobjetos en la platina del microscopio y fotografíe su observación con los objetivos 4X, 10X y 40X empleando tres aberturas diferentes del diafragma y tome las fotografías correspondientes.
5. Continúe la lisis de la muestra aplicando un pulso para las cuchillas por 2 min y repita los pasos 3 y 4 nuevamente.
8. Termine la lisis de la muestra con la aplicación de un pulso para las cuchillas por 2 min y repita los pasos 3 y 4 nuevamente.

2.4.3. Resultados esperados

A medida que comience la lisis celular en ambos procesos se comenzaran a percibir los aromas de las hojas de espinaca. También el sonido que se genera al macerar las hojas de espinaca cambiarán a medida que se va realiza la lisis en el mortero. Es de resaltar que el sonido será distinto entre la lisis con el agua desionizada y el amortiguador fosfatos. Uno de los indicadores de que se está lisando las células de los tejidos es el cambio de coloración de cada una de las soluciones.

La viscosidad de la muestra es un indicador de que se está realizando la lisis celular. Es muy importante estar verificando la viscosidad de la muestra, ya que al momento de que el extracto en solución es demasiado viscoso, es un indicador de que se ha roto las membranas nucleares y de que el ADN genómico ya está en solución.

Adicional a estos comentarios se incluyen referencias bibliográficas que resaltan la importancia del fraccionamiento celular, el uso y aplicación de la fragmentación celular por medio del mortero para la generación de resultados.

2.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Ver Anexo 4). Se anexa un formato base para colocar las imágenes obtenidas en el microscopio.

2.6. Referencias de apoyo

Anand RK, Chiu DT. Analytical tools for characterizing heterogeneity in organelle content. *Curr Opin Chem Biol.* 2012 Aug;16(3-4):391-9.

Klepárník K, Foret F. Recent advances in the development of single cell analysis A review. *Anal Chim Acta.* 2013 Oct 24;800:12-21.

Nasser A, Buchanovsky N, Gerstl Z, Mingelgrin U. Mineral induced mechanochemical degradation: the imazaquin case. *Chemosphere.* 2009 Mar;75(1):20-7.

Park YM, Lee WY, Lim YS, Lee JC, Lee BJ, Wang SG. New technique for preparing cartilage for intracordal injection: the freezing and grinding method. *J Voice.* 2014 Jul;28(4):508-11.

Satori CP, Kostal V, Arriaga EA. Review on recent advances in the analysis of isolated organelles. *Anal Chim Acta.* 2012 Nov 13;753:8-18.

Schmid A, Kortmann H, Dittrich PS, Blank LM. Chemical and biological single cell analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Feb;21(1):12-20.

Stamegna JC, Girard SD, Veron A, Sicard G, Khrestchatisky M, Feron F, Roman FS. A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Res.* 2014 May;12(3):673-9.

Formato para presentación de fotografías para su análisis.

Muestra XXXX Tipo de lisis XXXX

4X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Agua Desionizada
4X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Amortiguador Fosfatos
10X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Agua Desionizada
10X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Amortiguador Fosfatos
40X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Agua Desionizada
40X	Abertura 1	Abertura 2	Abertura 3	Amortiguador Fosfatos

Descripción y observaciones de los resultados

3 PRÁCTICA 2B. FRACCIONAMIENTO CELULAR (PARTE B) CENTRIFUGACIÓN CONTINUA

3.1. Introducción

Desde un punto de vista de laboratorio, el aislamiento de orgánulos es uno de los elementos claves para el desarrollo de la Biología Celular y de otras áreas biológicas. Por ello desde un principio, para lograr el avance de los estudios científicos enfocados a las células, fue necesario el establecer un procedimiento que permitiera tener cualquier orgánulo puro, manteniendo su integridad celular y que pudiese continuar la realización de sus procesos celulares. La solución a lo anterior fue la centrifugación; la cual consiste en la separación de partículas en una solución por medio de la fuerza centrífuga. El principio técnico se sustenta en que cada uno de los orgánulos de una célula tiene diferente forma, densidad y peso, por lo tanto, cada orgánulo tiene un patrón de separación específico en función del solvente en donde se realice la centrifugación.

Con base al principio anterior, las condiciones experimentales de centrifugación requieren varios factores a considerar para responder dos preguntas básicas en cualquier separación de orgánulos ¿Cuál

es la velocidad? y ¿Por cuánto tiempo se centrifuga una muestra para obtener el orgánulo o partícula de interés?

Para dar una respuesta correcta, es fundamental tener siempre presente que la centrifugación únicamente mueve orgánulos o partículas por la fuerza centrífuga y por lo tanto se pueden medir la distancia, estimar el tiempo y la distribución de la concentración de las partículas a lo largo del solvente. Dicha medición, en la cual, las moléculas u orgánulos se desplazan por el eje de la fuerza centrífuga, se denomina “Velocidad de sedimentación”, por lo tanto, su resultado es un coeficiente de sedimentación, el cual proporciona información del peso molecular y la forma de la partícula. Además, la estimación de la distribución de las moléculas y/o orgánulos a distintas concentraciones de la solución en condiciones de distribución constante en el tiempo se denomina “Equilibrio de sedimentación”, la cual indica el momento en donde los orgánulos o las partículas han alcanzado su punto máximo de movimiento y por lo tanto, se obtienen datos de los pesos moleculares, la densidad, composición de los orgánulos y las partículas.

Por lo anterior la velocidad a la cual sedimentan los orgánulos y las partículas en una suspensión, dependen de la naturaleza de la muestra, la composición química de la solución en el cual están suspendidas y de la fuerza aplicada a las partículas para ser separadas.

Con base a lo anterior, se puede considerar que los orgánulos y las partículas grandes sedimentarán más rápido en comparación con las pequeñas, es decir para los orgánulos celulares, como el núcleo que es el de mayor tamaño en cualquier célula sedimentará mucho más rápido en comparación que una vesícula de secreción que es mucho

menor en tamaño y composición química. En este sentido, se han desarrollado varios modelos matemáticos y tipos de centrifugación para establecer la velocidad y el tiempo para obtener la separación de un orgánulo todos ellos están sustentados en las características del medio de solución y de los orgánulos.

En la actualidad, se conocen cuatro tipos de centrifugación cuyos desarrollos se sustentan en la densidad de los orgánulos y/o partículas además de la concentración y tipo de solución en las que se encuentran suspendidas, siendo estas.

Centrifugación diferencial. También denominada centrifugación preparativa. Ella tiene fundamento en la densidad de los orgánulos y de las partículas. Por ello los orgánulos y partículas con densidades similares sedimentan en el mismo punto.

Centrifugación zonal. La separación de las partículas ocurre por diferencias en la velocidad de sedimentación debido a las distintas masas de los orgánulos y partículas que componen la muestra de estudio. Para ello se requiere un gradiente de densidad y por lo tanto al colocar la muestra en la parte superior del gradiente y al aplicar una velocidad constante, los orgánulos y las partículas se moverán a distinta velocidad en las diferentes partes del gradiente por su masa.

Centrifugación isopícnica. En ella se emplean medios de diferente densidad para la separación de los orgánulos y las partículas que poseen el mismo coeficiente de sedimentación.

Ultracentrifugación. Se sustenta en gradientes continuos o discontinuos y una de sus características son las altas velocidades que emplea para la separación de orgánulos o partículas.

Para la generación de cualquiera de estas formas de centrifugación se han desarrollado diferentes tipos de centrífugas las cuales pueden ser de una velocidad baja, alta y ultracentrifugación. Su identificación está en función de la capacidad de generar la fuerza centrífuga para realizar la separación de los orgánulos o partículas. Además, se requiere de un rotor el cual es un aditamento en donde se coloca la muestra y es la parte de la centrífuga donde se realiza el giro que generará la fuerza centrífuga.

Con el objetivo de conocer y aplicar las bondades y beneficios que tiene la centrifugación en el fraccionamiento celular, en la primera etapa de esta práctica se realizarán centrifugaciones diferenciales con extractos de hojas de espinaca, con agua desionizada y amortiguador fosfatos. Para la segunda etapa los productos obtenidos de cada centrifugación se observarán al microscopio para observar los productos obtenidos de cada fracción por medio de su tinción con el colorante básico azul de metileno. El procedimiento anterior permite ver el efecto que tiene el amortiguador y el tipo de lisis en la obtención de orgánulos.

3.2. Competencias

- Analiza y utiliza los conocimientos básicos de la centrifugación para la separación de orgánulos.
- Aprende el uso de centrifugas.
- Comprende y realiza centrifugaciones diferenciales.
- Distingue los distintos patrones de la centrifugación en función del solvente y sus fracciones mediante el uso del microscopio.

3.3. Materiales para la práctica

- 2 Caja Petri
 - Probeta de 50 ml.
 - Mortero con pistilo.
 - Procesador de alimentos.
 - Tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente de 15 ml.
 - Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Propipeta automática.
 - Pipetas de 5 y 10 ml
 - Micropipetas con puntas desechables de 20-200 y 100-1000 μ l.
 - Filtro de malla de tela.
 - Gasas.
 - Embudo.
 - Gradilla
 - Centrífuga.
 - Rotor con cabezal oscilante.
 - Balanza.
 - Vaso de precipitado.
 - Adaptador para rotor de cabezal oscilante para tubos de 15 ml.
 - Láminas porta y cubre objetos.
 - Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
- **Tejidos y soluciones:**
- Hojas de Espinaca.
 - Amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4).
 - Azul de Metileno al 2% disuelto en agua desionizada.
 - Agua desionizada.

➤ **Material requerido por los estudiantes**

- Bata de laboratorio.
- Guantes.
- Las personas que tengan cabello largo emplear cofia.
- Tijeras de disección.

3.4. Desarrollo de la práctica (Parte B).

3.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Por qué es tan importante conocer los fundamentos de la centrifugación?

¿Para qué me va a servir el saber emplear una centrífuga?

¿Existe alguna otra forma de separar orgánulos además de la centrifugación?

¿Qué ventaja me dará en mi vida profesional el saber los conceptos básicos de la centrifugación?

3.4.2. Procedimiento de laboratorio.

1. Enjuague las hojas de espinaca con agua corriente exhaustivamente.
2. Corte 10 hojas de espinaca con tijeras en fragmentos pequeños y colocar en una caja de Petri.

3. Coloque las hojas de espinaca en un mortero con 50 ml de agua ultra pura y macere suavemente por 5 min. Separe 500 microlitros en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y reserve.
4. Repita el paso 3 y emplee amortiguador fosfatos.
5. Repita los pasos 1 a 3 y realice la lisis de las hojas con el procesador de alimentos con un pulso de 2 min en 50 ml de agua desionizada y otro con amortiguador fosfatos.
6. Transfiera 10 ml del tejido macerado de ambas soluciones a tubos de 15 ml para cada muestra y reservar.
7. Filtre 10 ml de cada macerado por medio de una malla de tela y de 6-8 gasas y coloque cada uno en otro tubo cónico de 15 ml. Separe 500 microlitros de la parte filtrada y haga un frotis de la parte retenida en la malla de tela.
8. Para la centrifugación, equilibre las muestras pesando cada tubo junto con el adaptador para rotor de cabezal oscilante para tubos de 15 ml. En caso de tener diferencias en el peso iguale las cantidades con muestra para tener pesos iguales.

POR NINGÚN MOTIVO CENTRIFUGUE TUBOS CON DIFERENTES PESOS.

9. Centrifugue a 50 G por 5 min a cuatro grados centígrados.
10. Finalizada la centrifugación tome una foto y separe el sobrenadante en nuevo tubo y mantenga el botón del fondo que contiene los núcleos y otros restos celulares. Realice un frotis a ambas muestras en un portaobjetos teña con colorante básico azul de metileno, fije por calor y observe en el microscopio.

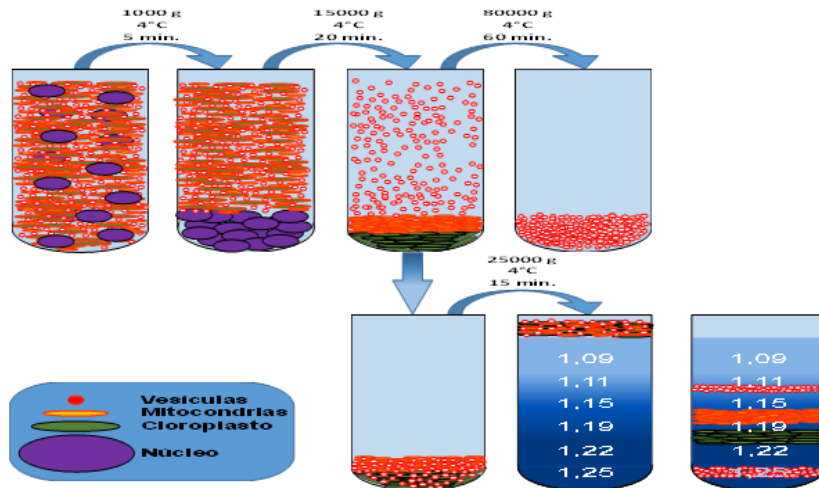
11. Tome 7 ml del sobrenadante que contiene cloroplastos, mitocondrias, vesículas y polisómas. Vuelva a pesar para realizar una segunda centrifugación a 2400 gravedades por 20 min a cuatro grados centígrados.

12. Retire el sobrenadante para realizar un frotis de este último y del pellet para teñirlos con el colorante básico azul de metileno al 2%. Observe ambas muestras en el microscopio con los lineamientos expuestos en la primera práctica.

3.4.3. Resultados esperados

La primera centrifugación diferencial contiene los núcleos y restos celulares en la pastilla que se formó en la parte inferior del tubo. Al pasar el sobrenadante a un nuevo tubo se tendrán cloroplastos, mitocondrias y vesículas, pero al aumentar la velocidad estas continuarán disueltas en la solución, mientras que los cloroplastos y las mitocondrias se desplazan a la parte inferior de tubo generando una nueva pastilla. En caso de que se deseara obtener las vesículas puras habría que realizar una tercera centrifugación; pero esto ya no aplica para los objetivos de la práctica (representación en Figura 1).

Al teñir los núcleos, mitocondrias y cloroplastos con el colorante básico con el colorante básico azul de metileno, en el microscopio se debe de observar, en el microscopio unos puntos azules que corresponde a la tinción de ácidos nucleicos y de proteínas. Esta coloración es un indicador de la presencia de los orgánulos purificados.



Las formas y sus colores de cada orgánulo, tienen como objetivo representar el procedimiento experimental mas no corresponden a su forma celular.

Figura 1. Representación de gráfica de la obtención de orgánulos celulares por medio de centrifugación diferencial y zonal. Los valores de velocidad, temperatura, tiempo y concentración de los gradientes son generales.

Se muestran algunos resultados obtenidos en prácticas del curso de biología celular en la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander. Así como referencias que sirvieron de apoyo para el diseño de esta práctica y el uso de la centrifugación en el fraccionamiento celular.

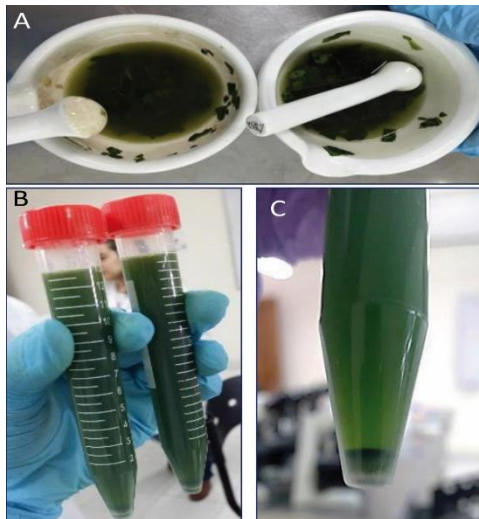


Figura 2. Muestra de resultados de lisis y centrifugación preparativa en extractos de hojas de espinaca. En la fotografía A se indica el lisado antes ser colocado en los tubos cónicos. En B se observa la muestra colocada para ser centrifugada, mientras que en C se muestra el resultado la concentración de los orgánulos.

3.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos indicados al principio de este manual y que corresponden a lo establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular.

3.6. Referencias de apoyo

Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014 Mar 25;3.

Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, Generozov EV, Govorun VM. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 2015 Nov 30;5:17319.

Mikami S, Hori H, Mitsui T. Separation of distinct compartments of rice Golgi complex by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Science* 2001 Vol.161. No.4, pp.665–675.

Møller MF, Søndergaard TR, Kristensen HT, Münster AB. Evaluation of a reduced centrifugation time and higher centrifugal force on various general chemistry and immunochemistry analytes in plasma and serum. *Ann Clin Biochem.* 2016 Sep 28.

Montero L de Guevara H. Centrifugación Métodos. Libro público en línea con dirección electrónica:
www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf

Rezeli M, Gidlöf O, Evander M, Bryl-Górecka P, Sathanoori R, Gilje P, Pawłowski K, Horvatovich P, Erlinge D, Marko-Varga G, Laurell T. Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated by Acoustic Trapping or Differential Centrifugation. *Anal Chem.* 2016 Sep 6;88(17):8577-86.

4

PRÁCTICA 3. LÍPIDOS DE MEMBRANA DE CLOROPLASTOS Y PERMEABILIDAD MEMBRANAL

4.1. Introducción

Las células desarrollan su ciclo de vida en medios ambientes cambiantes en condiciones físicas y químicas, los cuales la afectan de forma directa o indirecta su estructura y propiedades. Parte de esta adaptación se logra gracias a que las células están limitadas por una membrana plasmática compuesta de fosfolípidos y proteínas que separan el medio interno del externo y con ello las células regulan el medio intracelular para efectuar su: metabolismo, crecimiento, división celular y apoptosis o muerte.

Para ello, la membrana celular tiene propiedades que permiten la entrada y salidas de sustancias externas e internas a lo que se denomina “Permeabilidad de membranas”. En este sentido, este flujo de sustancias a través de la membrana está en función de sus cargas eléctricas, en donde las que tienen carga neutra atraviesan la membrana con mayor facilidad en comparación con las que tienen carga positiva o negativa. Otro factor involucrado en el paso de sustancias por la membrana celular es el tamaño de ellas.

Por las características antes mencionadas el transporte o movilidad de sustancias a través de la membrana se clasifica

en: transporte pasivo el cual se realiza a favor del gradiente de concentración o de carga eléctrica (de mayor a menor), mientras que el transporte activo es contra del gradiente (de menor a mayor) como por ejemplo gradiente de protones o electrolitos con proteínas de membrana como son las ATPasas o las bombas de sodio-potasio, entre otras.

Dentro de los tipos de transporte pasivo se encuentra la difusión simple en donde la molécula pasa a través de la membrana, ejemplo de ello son los gases o el alcohol. Otro es la osmosis, la cual está determinada por la presión producida por la diferencia de concentraciones de solutos a ambos lados de la membrana. Dependiendo si el medio donde se encuentra la célula es hipotónico, isotónico e hipertónico. Cabe señalar que las definiciones del medio antes indicado están en función de un punto de comparación, por lo que, si nos basamos principalmente en el medio y no en la célula, los conceptos se invierten. Es decir, en el caso de que una célula sea hipotónica con respecto a su medio, esto significa que el medio es hipertónico con respecto a la célula. El siguiente transporte es la Difusión Facilitada que es empleado para moléculas grandes como son la glucosa, para su realización se requiere de una proteína de membrana llamada acarreador que une a la molécula para introducirla o sacarla.

Es de resaltar que tanto el transporte pasivo y activo de la membrana celular también se presenta en las membranas de los organelos eucariontes, por consiguiente, el estudio de los mecanismos de transporte membranal se puede realizar con distintos orgánulos como son las mitocondrias o los cloroplastos por citar un ejemplo.

Los estudios científicos enfocados a la comprensión de las membranas celulares son desde distintos punto de vista, por ejemplo: químico con el fin de determinar la estructura atómica de los fosfolípidos, proteínas asociadas y otras moléculas que la componen, molecular al establecer la regulación de la expresión génica de los genes que codifican para las enzimas que realizan la biosíntesis de sus fosfolípidos o proteínas asociadas, fisiológico al determinar los cambios en el potencial de acción de ellas ante estímulos químicos o físicos y desde un punto celular comprendiendo la relación que tiene en la formación de orgánulos y procesos en las células.

Esta práctica del Laboratorio de Biología Celular tiene como objetivo observar distintas propiedades universales de las membranas celulares tomando como modelo de estudio a los cloroplastos de espinaca expuestos a distintas soluciones que cambiaran su estructura al microscopio y el patrón de difusión de pigmentos de fracciones de remolacha.

4.2. Competencias

- Comprueba los transportes a través de la membrana celular.
- Demuestra la importancia que tiene la concentración de las soluciones sobre las células.
- Observa y diferencia los fenómenos de hipotonía, isotonía e hipertonía.

4.3. Materiales y reactivos para la práctica

- Gradilla Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Láminas porta y cubre objetos.
 - Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
 - Micropipeta y puntas de 0.1-1 ml y de 0.02-0.2 μ l.
- **Tejidos y soluciones:**
- Hojas de espinaca.
 - Cubos de remolacha.
 - Amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4).
 - Agua desionizada.
 - Cloruro de sodio. 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM y 1 mM en amortiguador fosfatos.
 - Sacarosa al 5 %, 10 % 30 % y 50% en amortiguador fosfatos.
- **Material requerido por los estudiantes**
- Bata de laboratorio.
 - Guantes.
 - Las personas con cabello largo emplear cofia.

4.4. Desarrollo de la práctica

4.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Por qué es necesario el conocer las membranas de los cloroplastos?

¿Para qué me servirá en tener conocimientos de las membranas en mi actividad profesional?

¿Realmente se pueden ver el efecto de los canales de membrana en una remolacha?

¿Estos conocimientos los puedo emplear en otras áreas distintas a la biología?

4.4.2. Procedimiento de laboratorio.

1. Corte tiras de la hoja de espinaca de 0,5 cm de ancho y 2 cm de largo.
2. Obtenga cubos de remolacha de aproximadamente un centímetro.
3. Coloque dos series de tubos Eppendorf con 1 ml de las soluciones de cloruro de sodio. 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM y 1 mM en amortiguador fosfatos. Además de otras dos series de tubos Eppendorf pero con 1 ml de Sacarosa al 5 %, 10 % 30 % y 50% en amortiguador fosfatos.

4. Coloque en otros dos tubos Eppendorf 1 ml de agua grado 1 y en el otro 1 ml de amortiguador fosfatos.
5. Coloque en una de las series de cloruro de sodio y de sacarosa un cubo de remolacha por tubo, además de los tubos con agua y amortiguador fosfatos.
6. Incube por 15 min a temperatura ambiente Tome fotografías cada media hora y posteriormente por 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente.
7. Coloque los cortes de espinaca como se indica en el paso 3.
8. Incube las hojas a 37°C por 10 min.
9. Retire del periodo de incubación. Coloque cada muestra en su respectivo portaobjetos y observe al microscopio óptico.
10. Coloque el corte de la hoja de espinaca en 1 ml de amortiguador fosfato a temperatura ambiente por 5 min.
11. Retire el corte y observe nuevamente al microscopio.

4.4.3. Resultados esperados.

Los cubos de remolacha comenzaran a difundir sus pigmentos de forma inmediata al entrar en contacto con la solución. Observara que a concentraciones mayores de sodio y glucosa la difusión es menor y se formara un gradiente de color rojo el efecto de la difusión es mayor a medida que pasa el tiempo de exposición del cubo de remolacha con la solución.

Este efecto de difusión de soluciones en las membranas se puede observar al colocar en el microscopio los cortes de las hojas de espinaca que fueron colocados con las diferentes concentraciones de cloruro de sodio y de sacarosa. Ellos se observarán en las diferencias en su tamaño y forma de sus orgánulos siendo más visibles en los cloroplastos y la vacuola. Al colocar los cortes de hojas de espinaca nuevamente en amortiguador fosfatos observara que los orgánulos regresan a su estadio original.

4.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos a lo establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4). Además se incluyen referencias bibliográficas y videos que le ayudaran a dar la explicación de sus resultados para la realización del informe de la práctica.

Dirección de videos públicos de ayuda para la explicación de sus resultados.

https://www.youtube.com/watch?v=iBDXOt_uHTQ

https://www.youtube.com/watch?v=h_kWFM2faQ

<https://www.youtube.com/watch?v=QnQQkWxAKwI>

<https://www.youtube.com/watch?v=hfXGsJCOC9A>

<https://www.youtube.com/watch?v=bUE8gzMqqb8>

4.6. Referencias de apoyo

Abo-Ogiala A, Carsjens C, Diekmann H, Fayyaz P, Herrfurth C, Feussner I, Polle A. Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. *J Plant Physiol.* 2014 Feb 15;171(3-4):250-9.

Chan KX, Mabbitt PD, Phua SY, Mueller JW, Nisar N, Gigolashvili T, Stroehrer E, Grassl J, Arlt W, Estavillo GM, Jackson CJ, Pogson BJ. Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Aug 2;113(31):E4567-76.

Chen MF, Wang JD, Su TM. Concentration gradient effects of sodium and lithium ions and deuterium isotope effects on the activities of H⁺-ATP synthase from chloroplasts. *Biophys J.* 2009 Mar 18;96(6):2479-89.

Demé B, Cataye C, Block MA, Maréchal E, Jouhet J. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J.* 2014 Aug;28(8):3373-83.

Hamamoto S, Uozumi N. Organelle-localized potassium transport systems in plants. *J Plant Physiol.* 2014 May 15;171(9):743-7.

Majumdar A, Kar RK. Integrated role of ROS and Ca⁺² in blue light-induced chloroplast avoidance movement in leaves of

Hydrilla verticillata (L.f.) Royle. Protoplasma. 2016 Nov;253(6):1529-1539.

Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F. K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. J Plant Physiol. 2014 May 15;171(9):688-95.

Wu H, Shabala L, Zhou M, Shabala S. Chloroplast-generated ROS dominate NaCl(-) induced K⁽⁺⁾ efflux in wheat leaf mesophyll. Plant Signal Behav. 2015;10(5):e1013793.

Yoshinaga MY, Kellermann MY, Valentine DL, Valentine RC. Phospholipids and glycolipids mediate proton containment and circulation along the surface of energy-transducing membranes. Prog Lipid Res. 2016 Oct;64:1-15.

5 PRÁCTICA 4. COMPOSICIÓN DE PIGMENTOS DE CLOROPLASTOS

5.1. Introducción

Una de las principales características de la vida en nuestro planeta es la infinita variedad de colores que tienen los seres vivos, los cuales son específicos para cada especie. En la mayoría de los casos puede tener un carácter hereditario e inclusive genera diversos polimorfismos desde bacterias, protistas, hongos, plantas, hasta animales. Por lo anterior surge una pregunta fundamental dentro de la biología ¿Qué características tienen las biomoléculas que dan el color a la vida y cuál es su relación en las células de un organismo? En este sentido se ha demostrado que muchas regiones de moléculas que participan en los colores celulares pueden reflejar la luz y se les denominan cromóforos y auxocromos.

En las células y organismos, las moléculas no proteicas que participan en la coloración de las células con cromóforos y auxócromos son de varios tipos; dentro de los principales están los carotenoides los cuales están compuestos únicamente por hidrógeno y carbono es decir son hidrocarburos. Mientras que

el otro grupo corresponde a las Xantófilas cuya composición atómica incluye al oxígeno que puede estar como grupo hidroxilo, metoxilo, epóxido, carbonilo o carboxilo.

En la célula los carotenoides se encuentran asociados a las membranas, por lo que su distribución en los seres vivos es muy amplia. Por ejemplo, muchos carotenoides están en vegetales con o sin frutos que tienen colores verdes-amarillos, otros participan en los colores de las plumas de las aves o en los colores de los invertebrados.

Aún esta gran distribución de cromóforos y auxócromos en las moléculas celulares, se puede considerar que la principal de todas ellas, es la clorofila. Ella realiza la captación de un fotón, el cual se utiliza en la fotosíntesis para la transformación de energía lumínica a energía química en forma de ATP, moléculas orgánicas y la liberación de oxígeno.

Para el estudio de los carotenoides y clorofilas desde un principio se consideró sus características atómicas en la que, con algunas excepciones, tienen características lipídicas y por lo tanto son insolubles en agua, pero solubles en solventes como la acetona, éter, dietílico, hexano, cloroformo, piridina, el metanol y etanol. Debido a esta característica para la separación de las mezclas de carotenoides y/o clorofila de origen celular se emplea la Cromatografía que es una técnica de separación basada en el principio de retención selectiva, que permite analizar los distintos componentes de una mezcla, facilitando su identificación y cuantificación.

En las técnicas cromatográficas, los componentes de la mezcla a separar se pueden asociar a una de dos alternativas: una fase móvil fluida que se desplaza (solvente) y una fase inmóvil o estacionaria, la cual es la matriz en la que se mueve el solvente. Las interacciones que formen los diferentes compuestos con cada una de las fases, van a determinar las velocidades con que atraviesan la fase inmóvil, obteniendo como resultado la separación de los mismos. Por ejemplo, los componentes que logren mayor afinidad con la matriz se tardarán más en atravesarla.

Existen diferentes tipos de cromatografía, que varían en el tipo, colocación y naturaleza de las dos fases, siendo estas: Cromatografía plana, que puede ser en Papel o Capa Fina; y la Cromatografía en columna, ya sea de líquidos, de gases, o de fluidos supercríticos. La Cromatografía líquida a su vez puede ser de afinidad, intercambio iónico y filtración en gel.

De todos los procesos cromatográficos antes mencionados uno de los más empleados es la cromatografía de papel. En ella, la fase móvil será un solvente y la fase estacionaria consistirá en papel filtro. Por lo tanto, el solvente ascenderá por capilaridad a través del papel y las sustancias con mayor solubilidad se desplazarán más rápidamente junto con este. Por el contrario, los pigmentos que desarrollen mayores interacciones con la matriz, la atravesarán más lentamente. A su vez, los pigmentos más abundantes formarán bandas más anchas.

Dada la simplicidad y rapidez de la cromatografía en papel, a la fecha continúa siendo uno de los métodos más empleados para la identificación de clorofila A y B, β -Caroteno y Xantofilas de las hojas y las flores de las plantas. La presente práctica tiene como objetivo el conocer el procedimiento de la cromatografía en papel por medio de hojas de espinacas especie clásica para cromatografía en papel.

5.2. Competencias

- Comprende los principios fundamentales que dan lugar a la separación de sustancias en cromatografía.
- Diferencia las fases móvil y estacionaria que se emplean en una cromatografía plana en papel.
- Adquiere destreza en la realización de la Cromatografía de papel para separar pigmentos de cloroplastos.
- Identifica las interacciones entre la mezcla a separar y las fases, que dan lugar a los resultados obtenidos.

5.3. Materiales y reactivos para la práctica

- 4 Morteros.
- 4 Embudos.
- Papel Wathman 1M y 3M.
- Gradilla.
- Tubos de ensayo.
- Propipeta automática.
- Pipetas de 5 ml.

- **Tejidos y soluciones:**
 - Hojas de espinacas.
 - Isopropanol 60%-Éter 40%.
 - Etanol al 96%.
 - Acetona al 99.6 %.
 - Éter de Petróleo al 99.9 %.
 - Isopropanol 100%.

- **Material requerido por los estudiantes:**
 - Bata de laboratorio.
 - Guantes.
 - Cofia.
 - Cubrebocas tipo concha.

5.4. Desarrollo de la práctica

5.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Para qué me sirve el conocer los procedimientos de la cromatografía?

¿En que se utiliza y paraqué sirve la cromatografía?

¿En la UIS hay laboratorios especialistas en cromatografía?

¿Qué ventaja tendré como biólogo al saber los principios fundaméntales de la cromatografía?

5.4.2. Procedimiento de laboratorio.

El siguiente protocolo se debe de repetir para cada una de las muestras con los siguientes solventes:

Isopropanól 60%-Éter 40%.

Etanol al 96%.

Acetona al 99.6 %.

Éter de Petróleo al 99.9 %.

Isopropanol 100%.

1. Lave cuidadosamente las hojas de espinaca con agua.
2. Coloque las hojas de espinaca en un mortero.
3. Adicione 5 ml del solvente en el mortero.
4. Macere de forma vigorosa hasta que la mezcla adquiera una tonalidad del color del tejido.
5. Filtre el lisado por medio de papel Whatman 1M y reservar.
6. Haga tiras de 2 cm de ancho con el papel Whatman 3M lo más largas posibles y reservar.
7. Coloque 2 ml en un tubo de ensaye con una pipeta de 5 ml colocada en la propipeta automática.
8. Tome una tira de papel Whatman 3M y acomódela verticalmente dentro del tubo de ensayo que contiene el lisado

de modo que el extremo de abajo del papel quede en contacto directo con el lisado.

9. Observe cómo se va produciendo la separación de pigmentos.

10. Detenga la cromatografía mediante la separación del papel con los pigmentos separados del tubo de ensaye y deje secar a temperatura ambiente.

5.4.3. Resultados esperados.

Una vez finalizada la cromatografía se observará la separación de los carotenoides y/o clorofilas en el papel filtro, cuya distribución estará en función del solvente (Figura 3).

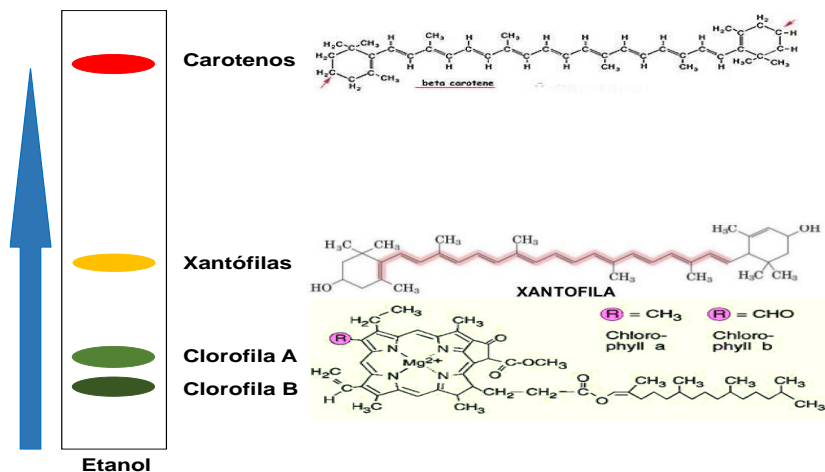


Figura 3. Representación del patrón de migración cromatográfico que observará con la separación de Clorofila y Xantófilas y Carotenoides con hojas de espinaca. La flecha azul indica el ascenso capilar del etanol con las moléculas, las cuales se separarán a durante la cromatografía. En el centro se indica el patrón de migración esperado y del lado izquierdo la formula química de los compuestos separados.

5.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4).

5.6. Referencias de apoyo

Ahsan H, Ahad A, Siddiqui WA. A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. J Chem Biol. 2015 Jan 20;8(2):45-59.

Bele AA and Khale A. An overview on thin layer chromatography. Inter. J Pharma Sci Res.2011; Vol. 2(2): 256-267.

Domenici V, Ancora D, Cifelli M, Serani A, Veracini CA, Zandomenighi M. Extraction of pigment information from near-UV vis absorption spectra of extra virgin olive oils. J Agric Food Chem. 2014 Sep 24;62(38):9317-25

Esteban R, Balaguer L, Manrique E, Rubio de Casas R, Ochoa R, Fleck I, Pintó-Marijuan M, Casals I, Morales D, Jiménez MS, Lorenzo R, Artetxe U, Becerril JM, García-Plazaola JI. Alternative methods for sampling and preservation of photosynthetic pigments and tocopherols in plant material from remote locations. Photosynth Res. 2009 Jul;101(1):77-88.

Garzón GA. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb. 2008;13(3),27-36.

Huang TL, Cong HB. A new method for determination of chlorophylls in freshwater algae. Environ Monit Assess. 2007 Jun;129(1-3):1-7.

Libro electrónico Técnicas Cromatográficas Química Analítica Instrumental II, (2007). Facultad de Química UNAM. Dirección electrónica:

www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111h.htm

Meléndez-Martínez AJ, Mapelli-Brahm P, Benítez-González A, Stinco CM. A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene. Arch Biochem Biophys. 2015 Apr 15;572:188-200.

Smith EL. The chlorophyll-protein compound of the green leaf. J Gen Physiol. 1941 May 20;24(5):565-82.

Smith EL, Pickels EG. The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of spinach as studied in the ultracentrifuge. J Gen Physiol. 1941 Jul 20;24(6):753-64.

6 PRÁCTICA 5. AISLAMIENTO DE NÚCLEOS

6.1. Introducción

El núcleo es un orgánulo altamente especializado y complejo de la célula. Él contiene la mayoría de la información genética que al ser expresada origina a las proteínas que constituyen y regulan la mayoría de los procesos celulares. Por ello, el núcleo celular es empleado en estudios sobre la transcripción de genes, síntesis, y procesamiento de RNA y el silenciamiento génico postranscripcional, entre otros.

Desde un punto de vista de laboratorio, el aislamiento de núcleos y al igual que cualquier orgánulo celular es uno de los elementos claves para el desarrollo de la Biología y por lo tanto la obtención de núcleos que mantengan sus procesos celulares es esencial para su estudio. Es por ello que desde un principio fue necesario el establecer el procedimiento que permitiera tener núcleos puros, manteniendo su integridad y que continuase sus procesos fuera de la célula.

La solución a lo anterior fue mediante un tipo de lisis celular y con la centrifugación con diferentes amortiguadores. Pero no todas las especies son iguales y concomitantemente la

protección de sus núcleos tienen elementos específicos para cada una de ellas, por lo tanto, las condiciones experimentales de rompimiento celular requieren considerar el tipo de célula u organismo del que se aislarán los núcleos. Este dato es fundamental ya que el método de lisis celular está en función de las características moleculares de la membrana y/o pared celular de la especie que será empleada y por lo tanto, la forma en que se rompan ambos elementos permitirá que se mantenga la estructura del núcleo. Además del conocimiento de la especie de la cual se obtendrán los núcleos permite establecer la velocidad a la cual sedimentarán, ya que todas las especies tienen diferente concentración de ácidos nucleicos y por ende el tamaño de la membrana nuclear es diferente. En este sentido debido a que el núcleo es el orgánulo más grande de toda la célula se considerará que él, será el orgánulo que sedimentará más rápido en comparación con el resto que son de menor tamaño.

Por todo lo anterior, el aislamiento de núcleos requiere primero de una lisis mecánica suave en amortiguador fosfatos. Posteriormente la filtración de la solución, para aplicar a la fracción resultante una centrifugación preparativa y posteriormente en gradiente, con ella se obtiene los núcleos aislados de los otros componentes celulares. Una vez obtenidos, ellos pueden ser estudiados desde un punto de vista celular por sus procesos intrínsecos o tiñendo con colorantes específicos que reaccionan con los ácidos nucleicos.

Con el objetivo de conocer las características metodológicas para el aislamiento de núcleos en el laboratorio de Biología Celular se realizará la purificación de núcleos a partir de gradientes de centrifugación de extractos de hojas de espinaca, e hígado de res. Posteriormente se observarán las diferencias morfológicas entre ellos, por medio de tinción con colorantes básicos como es el azul de metileno y Hematoxilina para observar sus ácidos nucleicos y ácidos para las proteínas que lo componen, Eosina para las proteínas como son histonas o DNA y RNA polimerasas y Sudán IV para sus membranas.

6.2. Competencias

- Comprende los fundamentos de la lisis mecánica para la obtención de núcleos celulares.
- Analiza y utiliza los conocimientos básicos de la centrifugación para la separación de organelos.
- Diferencia por tinciones las características de los núcleos de las células.

6.3. Materiales y reactivos para la práctica

- Cajas Petri.
- Probeta de 100 ml.
- Morteros.

- Filtro de malla de tela.
 - Gasas.
 - Embudos.
 - Gradilla
 - Tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente de 15 ml.
 - Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Balanza analítica.
 - Vaso de precipitado.
 - Láminas porta y cubre objetos.
 - Centrífuga.
 - Rotor con cabezal oscilante.
 - Adaptador para rotor de cabezal oscilante para tubos de 15 ml.
 - Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
 - Propipeta automática.
 - Pipetas de 5 y 10 ml.
 - Micropipeta y puntas para micropipeta de 0.1-1 ml y de 0.02-0.2 ml.
 - Pipetas Pasteur.
 - Vortex.
 - Baño María calefactor/de mesa.
 - Lámpara de alcohol.
- **Tejidos y soluciones.**
- Hojas de espinaca e Hígado de res.

- Amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4).
- Sacarosa al 5% disuelta en amortiguador fosfatos (peso/volumen).
- Sudan IV al 2%, Azul de Metileno al 2% y Eosina al 2% (peso/volumen) disueltos en amortiguador fosfatos (peso/volumen).
- Gradiente discontinuo de sacarosa: Sacarosa 80%, Sacarosa 30% y Sacarosa 10% en una proporción 1:3:2 respectivamente y disuelta en amortiguador fosfatos (peso/volumen). (Nota: el gradiente puede realizarse también con percoll a las mismas proporciones).
- Agua desionizada.

➤ **Material requerido por los estudiantes:**

- Bata de laboratorio.
- Guantes.
- Las personas con cabello largo emplear cofia.
- Tijeras de disección.
- Pinza hemostática.

6.4. Desarrollo de la práctica

6.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Para qué me sirve el saber la forma de aislar núcleos en el laboratorio?

¿Qué utilidad tienen el conocer los métodos de lisis y centrifugación para aislar núcleos?

¿Existen otros métodos para aislar núcleos que estén en internet?

¿Puedo usar el conocimiento de aislamiento de núcleos en otras áreas de la Biología?

6.4.2. Procedimiento de laboratorio.

1. Corte en fragmentos pequeños cada uno de los tejidos.
2. Coloque en un mortero y adicione 25 ml de amortiguador fosfatos.
3. Realice cuidadosamente la lisis del tejido para no fragmentar los núcleos.
4. Filtre el lisado por medio de una gasa hasta recuperar 10 ml.
5. Centrifugue a 600 g por 5 min.
6. Retire el sobrenadante y mantenga la pastilla que contiene los núcleos.
7. Resuspenda la pastilla con los núcleos en 5 ml de sacarosa al 5% disuelta en amortiguador fosfatos.
8. Coloque 3 ml de la fracción anterior en la parte superior del gradiente de sacarosa 80:30:10.

9. Centrifugue a 500 g por 15 min.
10. Por medio de una pipeta retire cuidadosamente cada una de las bandas que se formaron en el gradiente de sacarosa y colóquelas cada una en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
11. Adicione 1 ml de amortiguador fosfato a las fracciones obtenidas y mezcle gentilmente.
12. Centrifugue por cinco min a 1000 gravedades.
13. Retire el sobrenadante. Adicione 5 ml de amortiguador fosfatos y repita la centrifugación del paso 12.
14. Resuspenda la pastilla en 1000 μ l de amortiguador fosfato.
15. Coloque en tubos Eppendorf 200 μ l de los núcleos resuspendidas en 400 μ l de las soluciones: Azul de Metileno, Eosina, Hematoxilina y Sudán IV.
16. Adicione a cada colorante 200 microlitros de las fracciones resuspendidas y mezcle gentilmente por 30 segundos.
17. Incube las mezclas por 5 min a 40 grados centígrados.
18. De cada tinción realice un frotis de 30 μ l en el cubre objetos y fije la muestra por calor.
19. Sumerja los portaobjetos en un vaso de precipitado con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y observe sus muestras en el microscopio.

6.4.3. Resultados esperados

En caso de que la lisis de los tejidos sea muy fuerte se obtendrá una solución viscosa lo cual indica que se ha roto la membrana nuclear y la muestra tiene ácidos nucleicos. Por ello es necesario repetir la maceración nuevamente.

Tratar de que en la recuperación de cada centrifugación no mezclar con la parte superior de las fracciones que no contienen los núcleos (Figura 4).

La coloración con el colorante indefinido Sudán IV teñirá lípidos es decir membranas nucleares y otros lípidos presentes en el núcleo. El colorante básico Azul de metileno corresponde a la interacción con los grupos fosfatos del ADN, RNA y algunas proteínas, por ende, no se observará completamente la membrana nuclear. Mientras que el colorante ácido “Eosina” teñirá únicamente proteínas y por ello se observará la tinción de histonas, poros nucleares y proteínas nucleares

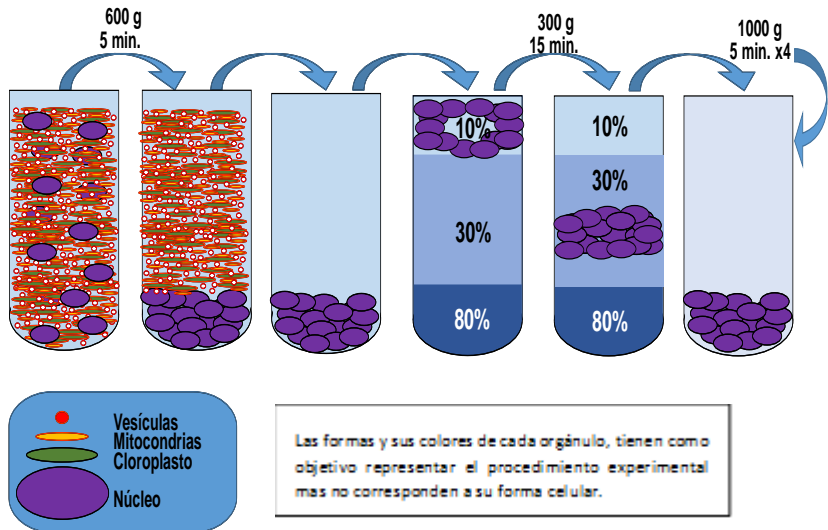


Figura 4. Representación del patrón de centrifugación para el aislamiento de núcleos. Los valores corresponden al procedimiento experimental.

Para observar el patrón de migración de núcleos en gradientes discontinuos se recomienda ver la figura 1 del manuscrito de Graham 2002. Mientras que los núcleos aislados de vegetales después del gradiente pueden ser ejemplificados en la figura 2 del artículo de Kumar and Sabhyata 2015. La tinción de núcleos de hojas de espinaca es similar a la que se observa en la figura 3 del manuscrito de Sikorskaite et al 2013. Mientras que la tinción de núcleos de hígado se ejemplifica en la figura 2 del manuscrito de Nagata et al 2010 y para núcleos purificados de cerebro el resultado será similar al que muestra en la Figura 1. Jankowska et al 2016.

6.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4).

6.6. Referencias de apoyo

Graham JM. Rapid purification of nuclei from animal and plant tissues and cultured cells. *ScientificWorldJournal*. 2002 Jun 7;2:1551-4.

Jankowska U, Latosinska A, Skupien-Rabian B, Swiderska B, Dziedzicka-Wasylewska M, Kedracka-Krok S. Optimized procedure of extraction, purification and proteomic analysis of nuclear proteins from mouse brain. *J Neurosci Methods*. 2016 Mar 1;261:1-9

Kumar S, Bhatia S. Isolation of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Nuclei and Measurement of Rate of Tryptophan decarboxylase Gene Transcription Using Nuclear Run-On Transcription Assay. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127892

Montero L de Guevara H. Centrifugación Métodos. Libro público en línea con dirección electrónica: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf

Nagata T, Redman RS, Lakshman R. Isolation of intact nuclei of high purity from mouse liver. *Anal Biochem*. 2010 Mar 15;398(2):178-84.

Sikorskaite S, Rajamäki ML, Baniulis D, Stanys V, Valkonen JP.
Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from
leaves of species in the *Solanaceae* and *Rosaceae* families.
Plant Methods. 2013 Jul 26;9:31.

7 PRÁCTICA 6. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

7.1. Introducción

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos, cuya función principal es la generación de ATP a través de un sistema de fosforilación oxidativo. También participan en numerosas rutas metabólicas, como son: la síntesis de nucleótidos, genera como subproducto la mayor parte de las especies reactivas de oxígeno, generación y modulación de las señales de Ca^{2+} y la muerte celular programada denominada apoptosis.

Según la Teoría de la Endosimbiosis Seriada, “Las mitocondrias son orgánulos intracelulares derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las proteobacterias con un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo”. Una característica importante en la que se basa esta teoría, es el sistema de doble membrana que poseen las mitocondrias, constituido por una membrana mitocondrial externa y otra interna separadas por un espacio intermembrana. La membrana externa la separa del citoplasma y permite el paso de moléculas pequeñas, mientras que la membrana interna es una barrera muy selectiva, lo que permite el mantenimiento del gradiente de protones para la síntesis de ATP y presenta una

serie de pliegues denominados crestas que le proporcionan una gran superficie.

Otra característica importante de las mitocondrias, y que sustenta la propuesta antes mencionada es que ellas poseen su propio genoma, denominado ADN mitocondrial (mtDNA) el cual codifica para proteínas, tRNA y ribosomas; por lo tanto, el resto de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes nucleares y traducidos mediante su ARN mensajeros con lo que se obtienen proteínas precursoras mitocondriales. Debido a la estructura de doble membrana de las mitocondrias, el importe de proteínas es un proceso complejo ya que las proteínas dirigidas a la matriz deben cruzar la membrana mitocondrial externa y la interna.

El mtDNA es altamente polimórfico, ya que presenta numerosas diferencias en la secuencia entre individuos del mismo grupo étnico, se ven incrementados entre individuos de grupos distintos. Los haplotipos de mtDNA se basan en patrones específicos de polimorfismos y algunos de ellos, parecen estar relacionados con diversos procesos como la motilidad espermática, el envejecimiento, la susceptibilidad a diversas enfermedades o la expresión de algunas mutaciones.

Debido a la importancia biológica de estas partículas intracelulares, se han desarrollado diversos métodos para su aislamiento. La mayoría de estos métodos se basan en el tamaño, relativamente grande de las mitocondrias y utilizan para su purificación la centrifugación de tejidos

homogeneizados. En esta práctica del Laboratorio del Curso Biología Celular se realizará un procedimiento para el aislamiento de mitocondrias de corazón de res con el fin de observar las diferencias en relación a sus patrones de sedimentación y tinción con colorantes indiferentes, ácidos y básicos. Este conocimiento es fundamental para que el biólogo que realice investigaciones bioquímicas, poblacionales o histológicas por citar algunos de ellos tenga los elementos básicos para la purificación de mitocondrias.

7.2. Competencias

- Comprende los procesos metodológicos para la purificación de mitocondrias.
- Aprende los elementos básicos de centrifugación para la purificación de mitocondrias.
- Aíslala mitocondrias de tejidos animales.
- Diferencia mitocondrias de órganos animales por tinción.

7.3. Materiales y reactivos para la práctica

- 3 Cajas de Petri.
- Probeta de 50 ml.
- Filtro de malla de tela.
- Gasas.
- Embudo.
- Gradilla

- Tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente de 15 ml.
 - Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Balanza analítica.
 - Vaso de precipitado.
 - Centrífuga.
 - Rotor con cabezal oscilante.
 - Adaptador para rotor de cabezal oscilante para tubos de 15 ml.
 - Propipeta automática.
 - Pipetas de 5 y 10 ml.
 - Micropipetas con puntas desechables de 0.1-1ml y 0.02-0.2 ml.
 - Pipetas Pasteur.
 - Procesador de alimentos.
 - Láminas porta y cubre objetos.
 - Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
 - Lámpara de alcohol.
- **Tejidos y soluciones:**
- Corazón de res.
 - Amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4).
 - Gradiente discontinuo de sacarosa al: 30%, 25%, 20%, 15% y 10% disuelta en amortiguador fosfatos (peso/volumen). Nota el gradiente puede ser también en Percol a una concentración 60%, 50%, 40%, 30%, 20% disueltas en amortiguador fosfatos.

- Sudán IV al 2%, Azul de Metileno al 2% y Eosina al 2%, disueltos en amortiguador fosfatos.
 - Agua desionizada.
- **Material requerido por los estudiantes:**
- Bata de laboratorio.
 - Guantes.
 - Las personas con cabello largo emplear cofia.
 - Tijeras quirúrgicas.
 - Pinza hemostática.

7.4. Desarrollo de la práctica

7.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Para qué me sirve el saber la forma de aislar mitocondrias en el laboratorio?

¿Qué utilidad tienen el tener mitocondrias aisladas?

¿Existen otros métodos para aislar mitocondrias además de la centrifugación?

¿Puedo usar el conocimiento de mitocondrias en biotecnología u otras áreas de la ingeniería?

¿Cuál es la utilidad del conocimiento de las mitocondrias en la biología?

7.4.2. Procedimiento de laboratorio.

1. Lave gentilmente con agua corriente 250 gramos corazón de res.
2. Con unas tijeras corte cada uno de los tejidos en fragmentos pequeños y coloque en su respectiva caja de Petri.
3. Coloque 25 ml de amortiguador fosfatos en el procesador de alimentos junto con 15 fragmentos de corazón de res.
4. Aplique un pulso por 3 min a temperatura ambiente.
5. Realice un frotis y observe en el microscopio para verificar el rompimiento celular.
6. Filtre el lisado con una malla de tela y con 6-8 gasas hasta obtener 10 ml del lisado.
7. Equilibre en balanza cada uno de los tubos que contienen en lisado.
8. Centrifugue a 1000 gravedades por 10 min a temperatura ambiente.

NO CENTRIFUGUE SI LOS TUBOS CON LA MUESTRA NO ESTÁN EQUILIBRADOS

9. Transfiera el sobrenadante que contiene las mitocondrias a un nuevo tubo.

10. Coloque 3 ml en la parte superior del gradiente de sacarosa 30, 25, 20, 15, 10 en una proporción 1:1:1:2:2.
11. Centrifugue a 3500 g por 45 min.
12. Equilibre y centrifugue la fracción recuperada a 3500 x g durante 10 min a temperatura ambiente.
13. Coloque las mitocondrias a cuatro tubos Eppendorf y afofe con 900 microlitros de amortiguador fosfatos.
14. Adicione 100 μ l de los colorantes Sudán IV, Azul de Metileno y Eosina y mezcle suavemente con vortex por 30 segundos.
15. Incube las mezclas por 5 min a 50 grados centígrados.
16. De cada tinción realice un frotis de 50 μ l en el cubre objetos y fije la muestra por calor.
17. Sumerja los portaobjetos en un vaso de precipitado con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y observe sus muestras en el microscopio.

7.4.3. Resultados preliminares e informe de la práctica.

Las mitocondrias se rompen en contacto con agua desionizada por choque osmótico, es fundamental que sus extractos y proceso de purificación no entren en contacto con ella para garantizar el éxito de su metodología.

Si se homogeniza por mucho tiempo, muchas de las mitocondrias se romperán disminuyendo la calidad de la preparación.

En la tinción con el colorante Sudán IV observará la tinción que corresponde a las grasas y membranas de las mitocondrias. Mientras que la tinción con Azul de Metileno corresponderá la tinción del genoma, RNA mitocondrial y proteínas. Finalmente, la tinción Eosina es únicamente con proteínas.

Es importante no traer fracciones de otras regiones de la centrifugación que pueden contaminar la muestra la representación de los patrones de centrifugación se indica en la Figura 5.

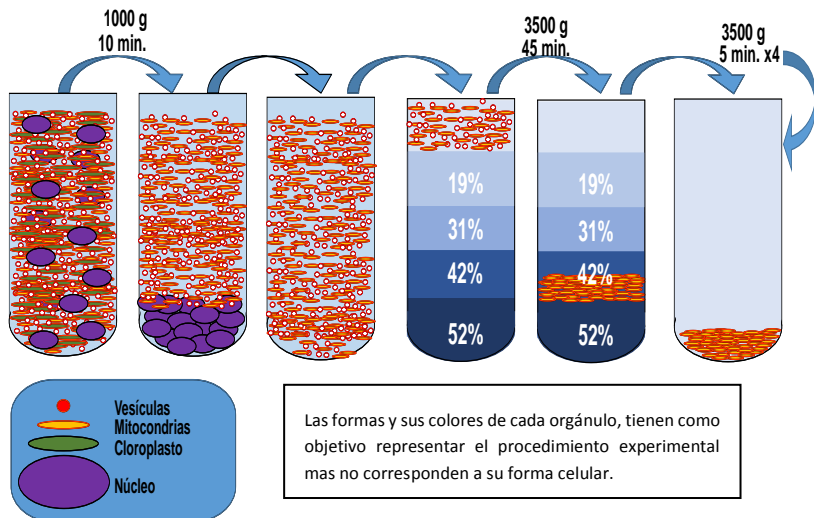


Figura 5. Representación del patrón de centrifugación para el aislamiento de mitocondrias. Los valores corresponden al procedimiento experimental.

7.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4).

7.6. Referencias de apoyo

Almeida A, Medina JM. A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1998 Mar;2(3):209-14.

Blan Sanmartín C. La proteína AOX como terapia génica para enfermedades mitocondriales. En Repositorio Institucional de Documentos de la Universidad De Zaragoza España. <https://zaguan.unizar.es/record/9023?ln=es#>

Chaiyarit S, Thongboonkerd V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal Biochem.* 2009 Nov 15;394(2):249-58.

Guo W, Jiang L, Bhasin S, Khan SM, Swerdlow RH. DNA extraction procedures meaningfully influence qPCR-based mtDNA copy number determination. *Mitochondrion.* 2009 Jul;9(4):261-5.

Liu S, Charlesworth TJ, Bason JV, Montgomery MG, Harbour ME, Fearnley IM, Walker JE. The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species. *Biochem J.* 2015 May 15;468 (1):167-75.

Maynard S, de Souza-Pinto NC, Scheibye-Knudsen M, Bohr VA. Mitochondrial base excision repair assays. *Methods.* 2010 Aug;51(4):416-25.

Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol.* 2011 Sep 15;589(Pt 18):4413-21.

Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, Hepple RT. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS one.* 2011 6(3), e18317.

Reinhart PH, Taylor W M, Bygrave FL. A procedure for the rapid preparation of mitochondria from rat liver. *Biochem. J.* 1982 204, 731-735.

8 PRÁCTICA 7. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

8.1. Introducción

Los cloroplastos junto con las mitocondrias y el núcleo, son unos de los orgánulos más estudiados. Se distribuyen por todo el citoplasma de las células de las hojas y contienen varios sub-compartimentos siendo estos : la envoltura del cloroplasto, que es un sistema de doble membrana que rodea el orgánulo, además de modular la comunicación del cloroplasto con la célula vegetal; el estroma, compuesto principalmente de proteínas solubles, es el sitio ocurre la asimilación de CO_2 lo cual es por el consumo de equivalentes reductores y ATP producidos por el flujo de electrones impulsada por la luz; y la membrana tilacoide, que es una red interna de la membrana altamente organizada formada por vesículas planas comprimidas en el se genera la fotosíntesis oxigénica.

Las vesículas tilacoides delimitan otro compartimento discreto, el lumen. Siendo el lugar de la fase luminosa de la fotosíntesis. Además, el compartimento del tilacoide ha sido muy estudiado desde un punto de vista funcional, estructural y bioquímico. Varios complejos enzimáticos que se encuentran en el siendo

estos: los dos fotosistemas, PSI y PSII, el citocromo b6f o plastoquinol—plastocianina reductasa y la ATP sintasa. Todas ellas actúan en serie y su función debe ser estrictamente regulada para evitar el desequilibrio de absorción de la luz o la saturación de la cadena de flujo de electrones en las plantas. Además, en las membranas de los tilacoides se localizan las clorofilas, carotenoides, xantofilas que participan en la fotosíntesis, la cual se resume como la transformación del dióxido de carbono, agua y luz a glucosa y oxígeno.

Dada la importancia que tienen los cloroplastos en las plantas, en la producción de biomasa vegetal y concomitantemente con el medio ambiente, ellos son muy utilizados en estudios de cambio climático o de la influencia de factores ambientales en el desarrollo de las plantas entre otros. Es por esta razón que la purificación de los cloroplastos es uno de los elementos fundamentales tanto en estudios de biología celular, bioquímica ecológica, impacto ambiental y cambio climático.

En esta práctica se realizará el aislamiento de cloroplasto por medio de centrifugación diferencial para su posterior tinción con colorantes indiferentes, ácidos y básicos. Es de resaltar que el protocolo es muy similar al que se realiza para la purificación de mitocondrias, sin embargo, puesto que los cloroplastos tienen un tamaño mayor que el de la mitocondria es indispensable realizar el protocolo con diferentes tiempos de lisis de las hojas en el procesador de alimento, velocidades de sedimentación y proporciones en concentración en el gradiente discontinuo.

8.2. Competencias

- Determina la importancia de la centrifugación diferencial como técnica para el aislamiento de cloroplastos.
- Comprende los pasos necesarios para desarrollar una centrifugación.
- Determina las diferencias morfológicas de cloroplastos entre especies por medio de tinción.

8.3. Materiales y reactivos para la práctica

- Cajas s de Petri.
- Probeta de 50 ml.
- Filtro de malla de tela.
- Gasas.
- Embudo.
- Gradilla.
- Mortero.
- Tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente de 15 ml.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Balanza analítica.
- Vaso de precipitado.
- Centrífuga.
- Rotor con cabezal oscilante.
- Adaptador para rotor de cabezal oscilante para tubos de 15 ml.

- Propipeta automática.
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Micropipeta de 1000 μ l.
- Micropipeta de 20-200 μ l.
- Pipetas Pasteur.
- Procesador de alimentos.
- Láminas porta y cubre objetos.
- Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.
- Lámpara de alcohol.

➤ **Tejidos y soluciones:**

- Hojas de espinaca.
- Amortiguador fosfatos ($\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 7.4).
- Gradiente discontinuo sea bien de sacarosa: Sacarosa 60%, 40%, 20%, 15%, y 10%, disueltas en amortiguador fosfatos (peso/volumen), en una proporción 1:1:1:2:2.
- Nota el gradiente puede ser también en Percol a una concentración 60%, 40%, 20% disueltas en amortiguador fosfatos, en la proporción antes indicada.
- Sudán IV al 2%, Azul de Metileno al 2% y Eosina al 2%, disueltos en amortiguador fosfatos.
- Agua desionizada.

➤ **Material requerido por los estudiantes:**

- Bata de laboratorio.
- Guantes.

- Las personas con cabello largo emplear cofia.
- Tijeras quirúrgicas.
- Pinza hemostática.

8.4. Desarrollo de la práctica

8.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Por qué es importante el conocer la forma de aislar cloroplastos?

¿Qué utilidad tienen el tener cloroplastos aislados en proyectos de calentamiento global?

¿En qué utilizare cloroplastos aislados?

¿Sirven los cloroplastos aislados para la biotecnología u otras áreas de la ingeniería y agronomía?

¿Puedo utilizar cloroplastos aislados para comprender la biodiversidad o en la producción de alimentos?

8.4.2. Procedimiento de laboratorio

1. Corte en fragmentos pequeños las hojas de espinaca.
2. Coloque en un mortero y adicione 50 ml de amortiguador fosfatos.

- 3.** Realice cuidadosamente la lisis del tejido para no fragmentar los cloroplastos.
- 4.** Filtre el lisado por medio de una gasa hasta recuperar 10 ml.
- 5.** Centrifugue a 1000 g por 5 min.
- 6.** Retire el sobrenadante y mantenga la pastilla que contiene los cloroplastos y los núcleos.
- 7.** Centrifugue a 200 g por 5 min.
- 8.** Retire el sobrenadante que contiene los cloroplastos.
- 9.** Coloque 3 ml en la parte superior del gradiente de sacarosa 60%:40%:20%:15%:10%.
- 10.** Centrifugue a 500 g por 15 min.
- 11.** Por medio de una pipeta retire cuidadosamente cada una de las bandas que se formaron en el gradiente de sacarosa 60%:40%:20%:15%:10% y colóquelas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 12.** Adicione 1 ml de amortiguador fosfato a las fracciones obtenidas y mezcle gentilmente.
- 13.** Centrifugue por cinco min a 3200 gravedades.
- 14.** Retire el sobrenadante y repita nuevamente una vez más los pasos 12 y 13.
- 15.** Resuspenda la pastilla en 1000 μ l de amortiguador fosfato.

16. Coloque en tubos Eppendorf 200 μl de: 2% Azul de Metileno, 2% Eosina y 2% Sudán IV. Todos ellos disueltos en amortiguador fosfatos.
17. Adicione a cada colorante 200 μl de las fracciones resuspendidas y mezcle gentilmente por 30 segundos.
18. Incube las mezclas por 5 min a 40 grados centígrados.
19. De cada tinción realice un frotis de 30 μl en el cubreobjetos y fije la muestra por calor.
20. Sumerja los portaobjetos en un vaso de precipitado con agua desionizada para retirar el exceso de colorante y observe sus muestras en el microscopio.

8.4.3. Resultados preliminares e informe de la práctica

Los cloroplastos se rompen en contacto con agua desionizada por choque osmótico es fundamental que sus extractos y proceso de purificación no entren en contacto con ella para garantizar el éxito de su metodología.

Si se homogeniza en el procesador de alimentos se genera la lisis de la mayoría de cloroplastos y disminuye la calidad de la preparación ya que estará contaminada con tilacoides que se observaran en la parte superior del gradiente discontinuo.

En la tinción con el colorante Sudán IV observará lo correspondiente a las grasas y membranas de los cloroplastos. Mientras que la tinción con Azul de Metileno corresponderá la

tinción del genoma, RNA del cloroplasto y proteínas. Finalmente, la tinción Eosina es únicamente con proteínas.

Trate de no contaminar la fracción de los cloroplastos con restos de la centrifugación anterior el procedimiento se representa en la Figura 6.

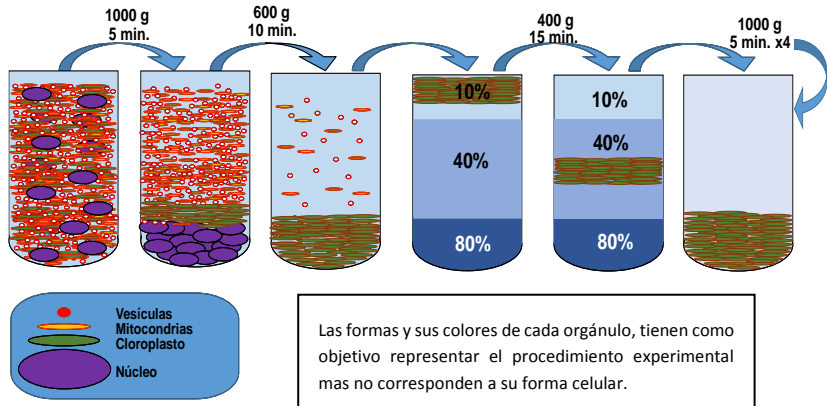


Figura 6. Representación del patrón de centrifugación para el aislamiento de cloroplastos. Los valores indicados en el gráfico corresponden a lo establecido al procedimiento experimental.

8.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4). En la sección de referencias se muestran artículos de apoyo para el informe de su práctica.

8.6. Referencias de apoyo

Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol.* 2016 Jun 23; 17(1):134.

Hüner NP, Dahal K, Bode R, Kurepin LV, Ivanov AG. Photosynthetic acclimation, vernalization, crop productivity and 'the grand design of photosynthesis'. *J Plant Physiol.* 2016 Sep 20; 203:29-43.

Skupień J, Wójtowicz J, Kowalewska Ł, Mazur R, Garstka M, Gieczewska K, Mostowska A. Dark-chilling induces substantial structural changes and modifies galactolipid and carotenoid composition during chloroplast biogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Plant Physiol Biochem.* 2017 Feb;111:107-118.

Su LW, Chang SH, Li MY, Huang HY, Jane WN, Yang JY. Purification and biochemical characterization of *Arabidopsis* At-NEET, an ancient iron-sulfur protein, reveals a conserved cleavage motif for subcellular localization. *Plant Sci.* 2013 Dec;213:46-54.

Tomizioli M, Lazar C, Brugière S, Burger T, Salvi D, Gatto L, Moyet L, Breckels LM, Hesse AM, Lilley KS, Seigneurin-Berny D, Finazzi G, Rolland N, Ferro M. Deciphering thylakoid sub-

compartments using a mass spectrometry-based approach. Mol Cell Proteomics. 2014 Aug;13(8):2147-67.

ieira Ldo N, Faoro H, Fraga HP, Rogalski M, de Souza EM, de Oliveira Pedrosa F, Nodari RO, Guerra MP. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers. PLoS One. 2014 Jan 2;9(1):e84792.

9 PRÁCTICA 8. MITOSIS

9.1. Introducción

La mitosis es el proceso de división celular eucarionte en el cual, a partir de una célula se originan 2 células con igual número y tipo de cromosomas. Este tipo de división celular es llevado a cabo por las células somáticas, aunque existen algunas diferencias entre células vegetales y animales, ya que en las primeras, la mitosis se lleva a cabo sin la presencia de centriolos y ásteres, ya que carecen de ellos.

Previo a los procesos de división celular de la mitosis, la gran mayoría de las estirpes celulares doblan su masa y duplican todos sus organelos, durante el ciclo celular, es un conjunto de procesos citoplasmáticos y nucleares coordinados para que el proceso de división sea exitoso.

El proceso de división celular mitótico inicia al final del periodo G2 de la interfase, y termina al iniciarse el periodo G1 de una nueva interfase. La mitosis está conformada por cinco etapas que han sido caracterizadas principalmente por los eventos que ocurren en los cromosomas en el interior del núcleo y por el ordenamiento de los orgánulos. Las etapas de la mitosis son: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Figura 7).

En la profase, cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas, resultado de la duplicación del ADN en el periodo S, o de síntesis del ADN en la interfase. A medida que progresa esta etapa, la cromatina se observa cada vez más condensada, para dar origen a las cromátidas hermanas del cromosoma, el cual se observa más corto y grueso. El nucléolo se desintegra y el nucleoplasma se mezcla con el citoplasma, esto ocurre en la metafase. Además, se forman los ásteres alrededor de los centriolos en cada polo celular, y comienza a observarse la presencia del huso mitótico. Durante la anafase ocurre la separación de los centrómeros, las cromátidas se separan y migran hacia los polos. Los microtúbulos unidos a los cromosomas, se acortan. La telofase inicia al término de la migración de los cromosomas hacia los polos. Los cromosomas comienzan a descondensarse y se agrupan en la cromatina, la cual es rodeada por cisternas del retículo endoplásmico que se fusionan para formar la nueva envoltura nuclear y dar origen al núcleo. Finalmente, en la citocinesis se originan 2 células con el rompimiento y fusión de la membrana citoplasmática de cada una de ellas.

La mitosis en las células vegetales se produce principalmente en los meristemas, que son los tejidos que permiten el crecimiento de la planta por lo que se encuentran en la punta de los tallos y de las raíces. Esta característica ha sido empleada por los científicos para estudiar los procesos que ocurren en la mitosis, siendo uno de los principales la tinción del meristemo de la raíz de la planta para posteriormente observar los eventos cromosómicos por medio de microscopía.

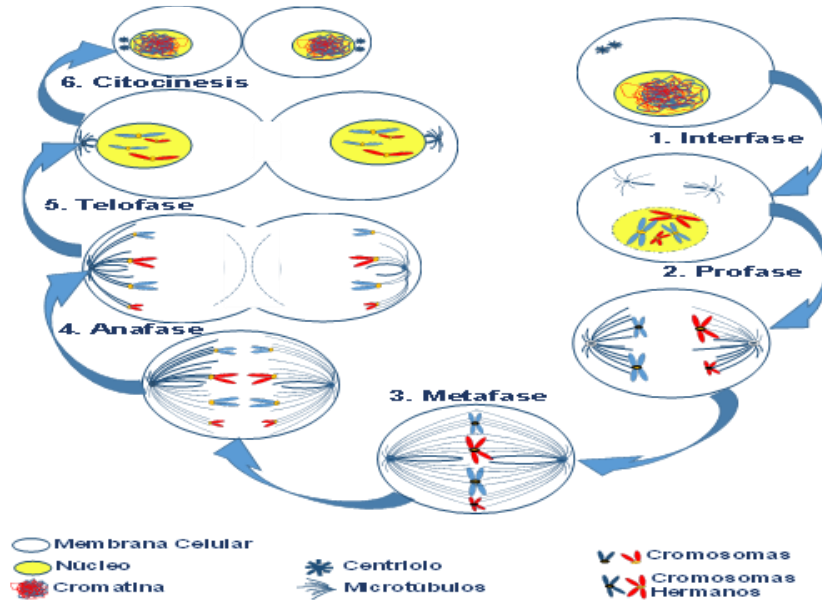


Figura 7 Representación de las etapas de la Mitosis.

Para ello se han desarrollado diferentes protocolos experimentales, uno de ellos fue diseñado por Vosa C.G et al., (1973). de la Escuela de Botánica de la Universidad de Oxford quien lo publicó en la revista *Experimental Cell Research*. El método tiene como objetivo teñir cromosomas vegetales y también puede ser empleado para el estudio de la mitosis. Él se sustenta en la tinción del ADN por medio de diferentes temperaturas, acetato de orceína y procesos de desnaturalización de organelos con ácidos clorhídrico y acético, además del rompimiento de las células con presión mecánica a lo que se conoce como técnica de aplastamiento o Squash.

Actualmente por su relativa sencillez al ser una tinción simple y tiempo de ejecución corto, es ampliamente empleado para observar la mitosis en células animales y vegetales sea bien

para fines: científicos, académicos o de enseñanza de la mitosis este último con la tinción de meristemas de la raíz de cebolla.

Esta práctica tiene como objetivo que el estudiante observe las diferencias de la mitosis *in situ* empleando como modelo de estudio meristemas de la raíz de: ajo, haba y cebolla como control. Siguiendo el protocolo propuesto Vosa C.G. *et al.*, (1974).

9.2. Competencias

- Conoce los principios y bases de la tinción de cromosomas.
- Reconoce los diferentes estadios de la mitosis en células vegetales.
- Comprende la importancia de la mitosis para estudios de Biología.
- Aprende a identificar eventos mitóticos por medio de tinción.

9.3. Materiales y reactivos para la práctica

- Tabla de madera cubierta con papel aluminio.
- Micropipetas de 1000 μl y puntas de 1 ml.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Gradilla para tubos Eppendorf.

- Láminas porta y cubre objetos.
- Baño de incubación con temperatura controlada.
- Microscopio marca NIKON modelo ECLIPSE E200.

➤ **Tejidos y soluciones:**

- Meristemos de la raíz de ajo, haba y cebolla.
- Amortiguador fosfatos.
- Solución fijadora 1 (Ácido acético/Metanol 1:3 volumen a volumen).
- Ácido clorhídrico 1N.
- Ácido acético al 40%.
- Solución de tinción1 (acetato de orceína al 1,5% disuelta en ácido acético al 40%).
- Solución de tinción2 (Rojo Congo al 1,5% disuelto en amortiguador fosfatos).
- Solución de tinción3 (Sudan IV al 1,5% disuelto en amortiguador fosfatos).
- Solución de tinción4 (Azul de metileno al 1,5 disuelto en amortiguador fosfatos).
- Agua desionizada.

➤ **Material requerido por los estudiantes:**

- Bata de laboratorio.
- Guantes.
- Las personas con cabello largo emplear cofia.

- Mango con hoja de bisturí.
- Pinza Punta Diamante 15cm.

9.4. Desarrollo de la práctica

9.4.1. Al inicio de la práctica los estudiantes discutirán en grupo la respuesta a cada una de las siguientes preguntas:

¿Por qué es importante el conocer las diferentes fases de la mitosis?

¿Para qué me sirve poder visualizar las etapas de la mitosis en mi actividad profesional?

¿Puedo aplicar el conocimiento de la mitosis en otras áreas de la biología?

¿Se puede comprender la biodiversidad con base a la técnica de mitosis de este laboratorio?

Puesto que el protocolo es aplicable a cualquier tipo de meristemo; el protocolo que se indica a continuación debe de emplearse de igual forma para los 3 tipos de meristemas de la raíz.

9.4.2. Procedimiento de laboratorio.

1. Lave con amortiguador fosfatos las raíces de la planta, no utilice agua desionizada para no dañar por choque osmótico las células y sus orgánulos.

- 2.** Cuidadosamente con un bisturí corte la parte final 3 raíces que contienen sus respectivos meristemas y colóquelas en un tubo Eppendorf.
- 3.** Adicione a los meristemas de la raíz 1 ml de Ácido Clorhídrico 1N, colóquelos a 60 grados centígrados en baño maría por 3 min.
- 4.** Retire el Ácido Clorhídrico 1N y lave los meristemas de la raíz una vez con agua desionizada.
- 5.** Retire el agua desionizada. Adicione 500 μ l de ácido acético al 40% colóquelos a 60 grados centígrados en baño maría por 3 min.
- 6.** Retire el ácido acético al 40%. Realice un lavado con agua desionizada (retirándola del tubo Eppendorf) y adicione 500 μ l de la respectiva solución de tinción a cada tubo.
- 7.** Incube la muestra por 9 min a 60 grados centígrados.
- 8.** El meristemo de la raíz seleccionado de la reacción anterior debe ser lavado con 1 ml de Ácido acético al 40% para la tinción con acetato de orceína y con amortiguador fosfatos para el resto de los colorantes por 30 seg. a temperatura ambiente.
- 9.** Realice un lavado con agua desionizada por 30 segundos y se coloque en un portaobjetos.
- 10.** Coloque el meristemo en un portaobjetos y cubrir con otro portaobjetos. Aplane cuidadosamente los meristemas de la raíz de forma manual. (A este procedimiento se le denomina "Aplastamiento o Squash").

11. Por medio del microscopio determine las células del meristemo de la raíz en mitosis con los objetivos 4X, 10X y 40X.

9.4.3. Resultados esperados.

Una vez concluidas las tinciones se observarán células en distintas fases o estados de división celular lo anterior es interpretado por las distintas formas de organización de los cromosomas, producto de las etapas de la mitosis independientemente del meristemo de la raíz. Las diferencias en la forma de los núcleos y características de los cromosomas se observarán entre las diferentes especies.

Además, los cromosomas impregnados por la orceína se observarán en color morado, en distintas fases de mitosis. El aspecto reticulado, así como el mayor tamaño de algunos núcleos, corresponde a las células que se encontraban en los procesos iniciales de la división mitótica.

El grado de coloración que se observe en las células de los meristemos de cada raíz está en función del grado de tinción entre la orceína y la cromatina de las células, además de que, en la raíz, se observarán las etapas de la mitosis en el meristemo en tanto que las células ya diferenciadas estarán en el resto de la raíz.

9.5. Informe de la práctica

El informe del laboratorio debe de ser acorde a los lineamientos establecidos en el programa académico de la asignatura Biología Celular (Anexo 4). En sección de Referencias de

apoyo se indican los artículos científicos para el diseño de la práctica y están disponibles en el aula virtual del curso, con el fin de ser material de consulta para el informe de su práctica.

9.6. Referencias de apoyo

Delgado LM, Lastra MU, Angel MLM. Estandarización de la técnica citogenética squash para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. Scientia et Technica, 2010 Dic;3(46): 74-79.

Galina N. Chelomina, Konstantin V. Rozhkovan, Anastasia N. Voronova, Olga L. Burundukova, Tamara I. Muzarok, and Yuri N. Zhuravlev. Variation in the number of nucleoli and incomplete homogenization of 18S ribosomal DNA sequences in leaf cells of the cultivated Oriental ginseng (*Panax ginseng* Meyer) J Ginseng Res. 2016 Apr; 40(2): 176–184.

Kapoor TM. Metaphase Spindle Assembly. Biology (Basel). 2017 Feb 3;6(1).

La Cour LF. Acetic-orcein: a new stain-fixative for chromosomes. Stain Technol. 1941;16, 169–173.

Liu Y, Nielsen CF, Yao Q, Hickson ID. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. Curr Opin Genet Dev. 2014 Jun;26:1-5.

Mir R, Aranda LZ, Biaocchi T, Luo A, Sylvester AW, Rasmussen CG. A DII Domain-Based Auxin Reporter Uncovers Low Auxin Signaling during Telophase and Early G1. Plant Physiol. 2017 Jan;173(1):863-871.

Östergren G, Heneen WK. A squash technique for chromosome morphological studies. *Hereditas* 1962 Feb;48(1-2):332-341.

Segré CV, Senese S, Loponte S, Santaguida S, Soffientini P, Grigorean G, Cinquanta M, Ossolengo G, Seiser C, Chiocca S. A monoclonal antibody specific for prophase phosphorylation of histone deacetylase 1: a readout for early mitotic cells. *MAbs*. 2016;8(1):37-42.

Urteaga O, Lallana VH. Optimización de una técnica de tinción para determinación de efectos citogenéticos en ápices radicales de *allium cepa*. *Rev Cient Agropec* 2005 Vol.9 No.1 pp.63-70.

Vosa CG. Acetic-orcein, a new stain for the detection of constitutive heterochromatin in plant and animal chromosomes. *Exp Cell Res*. 1973 Jun;79(2):463-5.

Wisoram W, Saengthong P, Ngernsiri L. Meiotic chromosome analysis of the giant water bug, *Lethocerus indicus*. *J Insect Sci*. 2013;13:39.

Xue Y, Toh SY, He P, Lim T, Lim D, Pang CL, Abastado JP, Thierry F. HPV16-E2 induces prophase arrest and activates the [cellular DNA damage response *in vitro* and in precursor lesions](#) of cervical carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Oct 27;6(33):34979-91.

ANEXO 1

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1.1 Seguridad de Reactivos y de Laboratorio

El laboratorio es un espacio físico en donde se realizan actividades de investigación científica y tecnológica. Los laboratorios se pueden clasificar en físicos, químicos, biológicos y de ingeniería. Su diseño está en función del tipo de actividad científica o tecnológica que se realiza. Sin embargo, existen dos tipos de riesgos en los laboratorios; el primero general y el segundo específico a la actividad que se está desarrollando en un momento determinado.

El objetivo general del diseño de todos los laboratorios es evitar cualquier riesgo y por lo tanto, brindar seguridad pasiva y activa para cualquier persona que se encuentre dentro de él. La seguridad pasiva radica en la distribución de sus zonas de acceso, emergencia y evacuación, además de la ubicación del mobiliario y materiales presentes en las áreas de trabajo, pasillos, e iluminación. Todos estos aspectos son y tienen que ser considerados por las personas cuando se encuentran dentro de un laboratorio. La seguridad activa son los dispositivos de protección como lo son detectores de humo,

alarmas, extintores y botiquín. A continuación, se explican aspectos de seguridad en laboratorio.

Los accesos y rutas de evacuación nunca deben ser obstruidos por ningún objeto o mueble que impida la salida segura, rápida y ordenada de las personas en casos de emergencia; de preferencia se deben contar con una salida adicional a la principal, para que se tenga otra opción de evacuación en caso de que la salida principal no sea accesible en un momento determinado. Las puertas tienen que tener una medida adecuada para que se disponga de la salida de una manera segura para más de una persona. De preferencia tienen que estar señalizadas con colores llamativos y con señales que permitan su fácil ubicación y comprensión.

Los pasillos de circulación; conectan los accesos con las zonas de trabajo, estos tienen que tener el espacio suficiente para que las personas circulen libremente sin alterar las actividades de las personas que se encuentren en el área de trabajo. Además, siempre tienen que estar despejados e iluminados, ya sea por luz solar o eléctrica, así como de emergencia. Por lo tanto, los pasillos siempre tienen que estar libres de equipo o pertenencias del personal del laboratorio. Además, los pasillos del laboratorio no son sitio de reunión, ya que interfiere con la dinámica de las aéreas de trabajo.

Todas las personas que visitan, laboran o realizan actividades temporales en el laboratorio tienen que tener la información

pertinente de la ubicación de las rutas y salidas de emergencia, así como los puntos de reunión, los cuales permiten determinar si todas las personas han salido del laboratorio en caso de emergencia.

Las zonas de trabajo son las superficies físicas en donde se realiza la actividad del laboratorio. Esta parte del laboratorio está constituido por el mobiliario y sirve para colocar los equipos y materiales de trabajo. Las superficies, del mobiliario, tienen que ser sólidas y perfectamente fijadas para evitar el movimiento. Además, las superficies de trabajo tienen que ser de un material que no reaccione con compuestos químicos y biológicos, tienen que ser fácil de limpiar y con un acabado que no genere reflejos molestos. Por lo general la mayoría de las superficies de trabajo presentan conexiones a las tuberías de agua, gas, aire a presión y para generar vacío, cuyas llaves tienen que estar rotuladas y con el mantenimiento preventivo respectivo.

Los estantes del laboratorio tienen que ser accesibles y seleccionados en función del tipo de material que se almacenara. En este sentido, para el almacenamiento de reactivos químicos el tamaño y material del estante estará en relación de los recipientes que serán almacenados.

1.2 medidas de seguridad para instrumental y equipos

1.2.1 Vidrio

Cualquier actividad científica y tecnológica implica el uso de instrumentos; material para la experimentación y para la protección. En los laboratorios químicos-biológicos se encuentra principalmente material de vidrio, debido a que es inerte, transparente y fácil de limpiar. Además, su maleabilidad a altas temperaturas permite que se elaboren de diferentes formas según sea la utilidad.

Hay diferentes tipos de vidrio; uno de ellos es el sódico, que tiene la ventaja de ser económico y fácil de trabajar, pero se dilata fácilmente a altas temperaturas lo que provoca su ruptura. El instrumental de vidrio sódico es de dos tipos: el delgado que se utiliza para calentar líquidos, pero presenta la desventaja que es más vulnerable a los golpes. El vidrio grueso se emplea para almacenar líquidos que no serán calentados y para crear ambientes especiales, ya que es más resistente a los golpes y a la presión. Para la fabricación de recipientes más resistentes al calor y a los golpes se utiliza el boro silicato, ya que por su menor coeficiente de dilatación evita su ruptura. Este tipo de vidrio se le denomina PIREX y se indica en todo el instrumental construido con este tipo de vidrio.

Para ambos recipientes de vidrio, su uso provoca su deterioro haciéndolos menos resistentes. Por lo tanto este tipo de instrumental después de su vida útil tiene que ser desechado

en contenedores específicos. Además, cuando se observen fisuras o rupturas no se tiene que calentar ya que estos se romperán por el calor.

Para calentar algún material de vidrio se tienen que intercalar entre la flama y el recipiente difusor del calor para aumentar la vida media del vidrio. En este sentido, las conexiones de los mecheros tienen que ser de material flexible para que puedan ser retiradas fácilmente. Puesto que el aspecto del vidrio es igual frío que caliente. El instrumental del vidrio se tiene que sujetar con la protección pertinente. Por otro lado, para almacenar soluciones en recipientes se utiliza embudos de vidrio con el fin de evitar que se derrame y se contamine la solución.

1.2.2 Otros materiales.

Gramaje→. Dentro del instrumental de laboratorio más utilizado se encuentran las espátulas y las balanzas analíticas. La primera permite verter un reactivo para ser pesado en la balanza. Una vez terminado el proceso de pesado la balanza tiene que ser limpiada con una brocha para descontaminar el área y mantener la higiene.

Líquidos→ Se utilizan materiales graduados y aforados, los cuales pueden ser vidrio o de plástico. Además, para la medición de volúmenes de 1 a 1000 μL se utilizan micro pipetas, las cuales emplean puntas de plástico con diversas

capacidades de retención y expulsión. Todo este tipo de instrumental no tiene que ser calentado ya que pierde todas sus propiedades.

Calentamiento→ En el calentamiento de algún material se utilizan mecheros de gas, parrillas eléctricas, estufas y hornos eléctricos o de micro ondas. Mientras que, para enfriar, se utilizan baños con mezclas con compuestos químicos, neveras, congeladores o ultra-congeladores lo cuales pueden generar temperaturas hasta de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si se requieren temperaturas menores se emplea el nitrógeno líquido, cuya temperatura es de $-195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$; la temperatura se determina con termómetros.

1.3 Reactivos del laboratorio.

Dentro de los laboratorios químicos y biológicos, los reactivos son una de los elementos fundamentales e imprescindibles para el éxito de cualquier ensayo biológico o químico que se realice. La calidad y pureza de un reactivo permiten el desarrollo de metodologías. Las soluciones obtenidas al mezclar reactivos se utilizan, para citar algunos ejemplos: en mantener y preservar tejidos u organismos completos; para la obtención de cortes histológicos para diferenciar distintas etapas del ciclo de vida de una especie o las diferentes estructuras que conforman el tejido en estudio. Para el desarrollo de métodos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que permitirán diferenciar una especie de otra; para el desarrollo de cultivos celulares o el preservar células. Por

definición un reactivo es una sustancia que interactúa con otra en una reacción química que da lugar a otras sustancias de propiedades, características y conformación distinta denominadas productos de reacción o simplemente productos.

La seguridad en el uso de un reactivo depende directa y exclusivamente de sus características. Por lo tanto, su manejo está en función de su grado de pureza y su concentración. Además, su manejo tiene que ser con cuidado para no dañarse y/o contaminarse con otro reactivo. La extracción del reactivo en el envase que lo contiene debe de ser con dispositivos que den seguridad a la persona y evite los riesgos antes mencionados. Para reactivos líquidos, estos se colocan en recipientes de vidrio o plástico para utilizar la cantidad deseada y como regla general de laboratorio el sobrante de reactivos líquidos nunca se regresa al envase original. Los reactivos siempre se tienen que mantener en su envase original para incrementar su vida útil.

La etiqueta es una parte esencial de los envases que contienen reactivos ya que provee información de: nombre del reactivo, fabricante, su grado de pureza, el peso molecular, además de las precauciones para su manejo, almacenamiento y medidas de seguridad en caso de algún accidente. Antes de comenzar a utilizar algún reactivo es indispensable el conocer las características del mismo y las medidas de seguridad que se tiene que tener en caso de algún derrame o de que caiga en la

piel u ojos de la persona u otras que estén en el área de trabajo. Toda esta información se encuentra en la ficha técnica de cualquier reactivo la cual puede tener dos tipos de códigos que se indican en las Fig.1 y 2.



Figura 1. Etiqueta y código de seguridad de reactivos en colores y números. La imagen del lado izquierdo ejemplifica una etiqueta de reactivo de laboratorio, se indican sus características en cuadros. Los códigos de seguridad en colores y números se muestran en la imagen de lado derecho, dentro de cada casilla se coloca el número que corresponde a las características del compuesto químico que se encuentra en el recipiente.























	Clases de peligros	Identificación de sustancia anterior a CLP	Identificación de sustancias según CLP
Peligros físicos	EXPLOSIVOS		
	INFLAMABLES		
	COMBURENTES		
	GASES A PRESIÓN	Sin pictograma específico	
	CORROSIVOS		
PELIGROS PARA LA SALUD	Clases de peligros	Identificación de sustancia anterior a CLP	Identificación de sustancias según CLP
	TÓXICOS		
	CORROSIVOS		
	SENSIBILIZANTES RESPIRATORIOS O CUTÁNEOS	Sin pictograma específico	
	MUTAGENICIDAD EN CÉLULAS	Sin pictograma específico	
	CARCINOGENICIDAD	Sin pictograma específico	
	TÓXICOS PARA LA REPRODUCCIÓN Y EFECTOS SOBRE LA LACTANCIA O A TRAVÉS DE ELLA	Sin pictograma específico	
	TOXICIDAD ESPECIFICA PARA DETERMINADOS ÓRGANOS TRAS UNA EXPOSICIÓN ÚNICA	Sin pictograma específico	
	TOXICIDAD ESPECIFICA PARA DETERMINADOS ÓRGANOS TRAS EXPOSICIONES REPETIDAS	Sin pictograma específico	
	PELIGRO POR ASPIRACIÓN	Sin pictograma específico	
PELIGRO PARA EL MEDIO AMBIENTE	Clases de peligros	Identificación de sustancia anterior a CLP	Identificación de sustancias según CLP
	PELIGRO PARA EL MEDIO AMBIENTE		

Figura 2. Imágenes de códigos internacionales para indicar las características de reactivos químicos que son almacenados o transportados en contenedores específicos. Las columnas indican el significado de cada símbolo.

Todos los laboratorios tienen un área específica para el almacenamiento y manejo de los reactivos. Lo anterior contribuye a aumentar la vida de los reactivos además de evitar accidentes. Los reactivos que no son compatibles tienen que estar separados por material inerte. En el almacén de reactivos se tiene que tener un control del número de envases presentes en el laboratorio, la fecha de ingreso, su caducidad y la fecha de término. Además, se tiene que tener un riguroso orden en la distribución de los reactivos del laboratorio y estos no se tienen que estar cambiando de lugar. Nunca se transportan productos químicos incompatibles y en caso de ser varios se deberá utilizar una canasta la cual no tendrá reactivos incompatibles. Así mismo los reactivos no tienen que colocarse en los pasillos en puertas de salida o en áreas de paso. En especial los cilindros que contienen gases los cuales tienen que estar en áreas y asegurados con aditamentos que no permitan que el cilindro se caiga y se encuentren ubicados entre conexiones que los transportaran al área de trabajo.

1.4 Seguridad para manejo de material biológico.

De acuerdo al manual de Bioseguridad en el laboratorio, emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los laboratorios biológicos se clasifican en función de los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos que pueden estar en una muestra biológica. Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios

para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo. Por lo que los laboratorios se clasifican por grupos de riesgo del 1 al 4. Siendo estos: laboratorio básico – nivel de bioseguridad 1; laboratorio básico – nivel de bioseguridad 2; laboratorio de contención – nivel de bioseguridad 3, y laboratorio de contención máxima – nivel de bioseguridad 4.

El empleo de animales de laboratorio y otros organismos obtenidos a partir de su hábitat, siempre y cuando se tenga el permiso por la autoridad nacional competente, con fines de identificación, experimentales y de diagnóstico, impone al usuario la obligación moral de adoptar todas las medidas necesarias para evitar que aquéllos padezcan dolores o sufrimientos innecesarios. Por lo que hay que proporcionar a los animales un alojamiento cómodo, higiénico y de dimensiones suficientes, así como agua y comida de buena calidad y en cantidad suficiente. Al final del experimento habrá que sacrificarlos con el procedimiento menos cruel posible.

Las medidas básicas de seguridad en el manejo de material biológico implican una serie de reglas para la seguridad del individuo, así como con el entorno de trabajo. Para que se produzca un accidente por agente biológico deben concurrir básicamente cuatro elementos: un huésped susceptible, un agente infeccioso, una concentración suficiente de éste, una ruta de transmisión apropiada. De todos ellos, el que mejor se puede controlar en el laboratorio es la ruta de transmisión.

Las rutas de transmisión más comunes en el laboratorio son la aérea y la inoculación directa, muy por encima de todas las demás, aunque la oral, la percutánea y el contacto directo con la piel o las mucosas también son posibles. Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a material infeccioso, así como mordeduras, arañazos etc., se comunicarán al responsable de la práctica.

Todo material a utilizar debe encontrarse esterilizado al momento de utilizarlo, en caso de no contar con este equipo, el material puede ser esterilizado con etanol antes de realizar el procedimiento. Cuando sea necesaria la anestesia de animales de laboratorio se trabajará en ambiente ventilado y bajo campana. Adicionalmente, en caso de detectar la presencia de cualquier tipo de roedor o insecto que se encuentre en el laboratorio se tiene que retirar del laboratorio. Todo el material punzante debe desecharse en recipientes especiales para ello. Al finalizar la manipulación, el material que pueda ser infeccioso o de animales, se realizará una estricta limpieza de las manos, junto con el correcto manejo de estos en los lugares asignados para su depósito.

1.5 Medidas de seguridad del personal en el laboratorio.

Aun cuando se tengan las mejores instalaciones para el desarrollo de investigaciones científicas o tecnologías, estas son inservibles si el personal no está capacitado en las medidas de seguridad individual y colectiva.

1.5.1 Seguridad Individual

Comprende a todas las medidas mínimas de seguridad que debe conocer y ejecutar un individuo que se encuentre trabajando en laboratorio. En este sentido siempre se tiene que garantizar su seguridad con el mínimo equipo adecuado, siendo la bata de laboratorio (de preferencia de manga larga) el mínimo equipamiento necesario en cualquier nivel de seguridad. No es recomendable el uso de ropa que exponga la piel del individuo cuando se esté realizando actividades en el laboratorio. A saber: faldas o minifaldas medias de fibras sintéticas pantalonetas o pantalones cortos. El calzado no tiene que ser abierto y en caso de que se utilice bata de manga corta se recomienda el uso de ropa que proteja los brazos. En ciertos laboratorios el uso de gafas de protección es obligatorio.

1.5.2 Seguridad colectiva

La seguridad colectiva se incrementa cuando los individuos saben cómo actuar ante hechos inesperados generadas por situaciones naturales, laborales o de otra índole. Individuos bien capacitados tienen el conocimiento de cómo participar de manera conjunta para el desalojo del laboratorio, así como del edificio en donde se encuentren. Las reglas de seguridad en los laboratorios comprenden la serenidad, seriedad y concentración de la(s) persona(s) que se encuentren trabajando en el laboratorio, limpieza y asepsia del área, manejo del material necesario, así, como el conocimiento de los protocolos de seguridad, prevención y manejo.

ANEXO 2

MICROSCOPIA

1. Introducción.

La célula es la unidad fundamental de la vida. En nuestro planeta se ha determinado que las células pueden ser individuales, mientras que en otros casos se encuentran asociadas entre ellas por medio de uniones moleculares. Por esta característica una clasificación que se utiliza para identificar a un organismo, se da en función del número de células que lo componen, organismos unicelulares compuestos por una sola célula como son las bacterias, algunos hongos o muchos organismos eucariontes que componen al plancton o que habitan en suelos. En tanto que los organismos pluricelulares son seres vivos conformados por dos o más células, dentro de este grupo están las plantas, los animales u hongos. No obstante, independientemente del número y composición de las células que forman a los seres vivos, el microscopio ha permitido comprender muchos elementos, procesos celulares y eventos fisiológicos que son imposibles de observar a simple vista.

El crédito de la invención del microscopio óptico de dos lentes ha sido de mucha controversia, pero en general se le ha otorgado a Zaccharias Janssen (1587–1638) y a su hijo Hans

Janssen (1534–1592). Los microscopios producidos por ellos eran constituidos por un tubo el cual tenía en cada extremo una lente. Sin embargo, a diferencia de los microscopios desarrollados por Janssen, Anton van Leeuwenhoek construye su propio microscopio con el cual logra obtener una amplificación de 40 hasta 160 veces de la muestra (Karamanou et al, 2010).

Con su microscopio Leeuwenhoek describe por primera vez células de bacterias y otros microorganismos a los cuales les denominó “Animáculos”. Además, estudió muchos tejidos como el hígado, cerebro, tejido graso y músculo. También describió las células presentes en varios fluidos biológicos como fueron la sangre, semen, orina, sudor y lágrimas. En la sangre describe por primera vez los glóbulos rojos, y a los espermatozoides en el semen (Karamanou et al, 2010). Actualmente se conocen otros tipos de microscopios ópticos o electrónicos, cada uno con características diferentes que permiten observar con más detalle ciertas estructuras.

1.1 Microscopios Ópticos

Microscopio de contraste de fases: Con él es posible ver células pequeñas, ya que tiene un índice de refracción diferente a su alrededor y esto es lo que se utiliza para crear una imagen de mayor contraste, comparado con la que se obtiene de un microscopio normal. Además, la imagen aparece clara sobre un fondo oscuro, ya que la imagen depende de las diferencias en

el índice de refracción de la muestra y del medio circundante, si la muestra se sumerge en un medio con igual índice de refracción, la imagen desaparece.

Microscopio de campo oscuro: Su sistema de condensador fue modificado para dirigir la luz a la muestra desde los lados, para que solo la luz difractada por la muestra pasa al ocular y se hace visible sobre un fondo oscuro, para que esto ocurra se requiere en primer lugar que la apertura numérica del condensador sea mayor que la apertura numérica del objetivo. Se emplea para ver células vivas, las cuales no se han aplicado sustancias fijadoras ni colorantes, algunos ejemplos pueden ser protozoarios, bacterias, células descamadas, entre otros.

Microscopio de fluorescencia: Se utiliza para observar muestras que tiene fluorescencia en su interior ya sea naturalmente o porque han sido tratadas con colorantes fluorescentes. La fluorescencia es la propiedad que tienen muchas sustancias químicas de emitir luz de un color después de excitarlas con luz de otro color. En el microscopio de fluorescencia la luz de excitación es eliminada con un filtro colocado entre el objetivo y el ocular, de modo que sólo se ve la luz emitida.

1.2 Microscopios Electrónicos

Microscopio electrónico: Se utilizan electrones en vez de rayos de luz, lo lentes funcionan como electroimanes y todo es

al vacío. Algunos de los electrones que pasan por la muestra son difractados creando una imagen que se observa en una pantalla sensible a estos. La resolución obtenida con el microscopio electrónico es mucho mayor que la conseguida con el microscopio óptico. Con el microscopio electrónico pueden verse fácilmente objetos de 1 nm (10^{-9} m), incluso es posible observar sustancias de tamaño molecular.

Microscopio electrónico de barrido: La muestra estudiada se recubre con un metal pesado (oro); hacia la muestra se dirige un rayo de electrones que la va recorriendo y explorando, los electrones dispersados por el metal activan la pantalla en la que se forma la imagen. Con este microscopio pueden observarse muestras muy grandes, debido a que el aumento oscila entre uno tan bajo como x15 y uno tan alto como x100,000, pero sólo puede observarse la superficie de un objeto.

Si bien cada tipo de microscopio proyecta una imagen de acuerdo a su función; la parte más importante de este son los objetivos, ya que estos sistemas de lentes establecen la calidad de la imagen en cuanto a su nitidez y la capacidad que tiene para captar los detalles de la misma; de igual manera, existen otros factores que contribuyen en la formación de la imagen, siendo uno de estos el índice de refracción.

Se denomina índice de refracción a la relación entre la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el medio

transparente utilizado. La velocidad de la luz es de 300.000 Km/sg en el aire. Al atravesar un medio transparente como el vidrio, su velocidad se reduce a 200.000 km/sg. Por lo tanto, el vidrio tendrá un índice de refracción de 1.5 (Montalvo, 2010). El índice de refracción se expresa mediante la fórmula:

$$RI = \frac{\textit{Velocidad de la luz en el aire}}{\textit{Velocidad de la luz en el medio}}$$

Además, para observar las muestras con mayor detalle es necesario aumentar el objetivo con el que se está observando, al hacerlo la distancia entre el objetivo y la muestra va disminuyendo y los rayos de luz que atraviesan la muestra se difractan, por lo que hizo necesaria la implementación de un medio diferente al aire, cuyo índice de refracción se asemejara al índice de refracción del vidrio del porta objetos, de ahí que se utilice el aceite de inmersión, ya que elimina completamente la desviación de los rayos de luz y aumenta considerablemente la eficacia de los objetivos de los microscopios.

La microscopia continuará avanzando con la única finalidad de continuar mejorando las imágenes, y con esto sería más fácil y rápida la clasificación taxonómica de las especies, también facilitaría el estudio morfológico y ultraestructural de células y tejidos.



Figura 3. Fotografía del Microscopio Óptico que se utiliza en el Laboratorio de Biología Celular.

Uso del microscopio en el laboratorio.

El usuario se debe de dirigir al estante en donde se almacenan los microscopios. En él, reconocerá un sistema de ventilación para evitar la formación de microorganismos en los lentes del microscopio.

Para tomar el microscopio óptico como se muestra en la figura 3 introduzca los dedos de una de sus manos en la ranura trasera de la parte superior del brazo y la otra mano colóquela

en la parte inferior de la base y llévelo a su lugar de trabajo. Antes de conectar el enchufe a la toma de energía eléctrica verifique que el cable de luz esté bien conectado al microscopio. Después de encenderlo, realice los siguientes pasos mencionados a continuación:

1. Regular la luz que ha de llegar a la lámpara.
2. Poner la laminilla sobre la platina ajustándola con la pinza.
3. Colocar el objetivo de 4X.
4. Verificar y/o colocar el condensador en la posición adecuada para la observación.
5. Observe en los oculares y comience a acortar la distancia pertinentemente con el macrométrico hasta que se observe la muestra e inmediatamente de nitidez con el micrométrico.
6. Una vez que observe la muestra tome una fotografía colocando la cámara en el ocular y realice por lo menos 3 observaciones con diferentes aperturas del diafragma e intensidades de luz.
7. Cambiar al objetivo de 10X girando el revólver y graduando la nitidez con el micrométrico, repetir el paso 6.
8. Se cambia al objetivo de 40X y se repiten el paso 6.
9. Se cambia al objetivo de 100X girando el revólver, se debe poner una gota de aceite de inmersión y se repite el paso 6.

Para determinar el aumento de cada imagen se multiplica el aumento del objetivo con el del ocular (Figura 4).



Figura 4. Angulo de inclinación de los objetivos.

Referencias

Karamanou M, Poulakou-Rebelakou E, Tzetis M, Androutsos G. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Rev Argent Microbiol.* 2010 Oct-Dec;42(4):311-4.

MONTALVO ARENAS CE 2010. Microscopía. Disponible en dirección web:

https://www.google.com/search?sclient=psy-ab&client=firefox-b&q=montalvo+indice+de+refraccion&oq=montalvo+indice+de+ref&gs_l=serp.1.0.33i21k1j33i160k1.3396.8133.0.11081.14.14.0.0.0.0.210.2346.0j13j1.14.0...0...1.1.64.psy-ab..0.9.1381...0i0i67k1j0i22i30k1j0i19k1j0i22i30i19k1j33i22i29i30k1.pZH82cxDNLs&pbx=1&bav=on.2.or.r_cp.&bvm=bv.149760088.d.cGc&biw=1252&bih=602&ech=1&psi=wylMWluHE4LUjwP3korgAw.1489773249403.3&ei=wylMWluHE4LUjwP3korgAw&msg=NCSR&noj=1&qfe_rd=cr

ANEXO 3

LISIS CELULAR

1.1 Lisis Celular

La lisis celular es considerada como el rompimiento de la célula por medios mecánicos, químicos o la combinación de ambos, en donde la selección del procedimiento para la lisis celular estará en función de las propiedades del tejido o células de estudio y el objetivo e hipótesis que se desee demostrar con un proceso celular determinado.

Los métodos mecánicos de lisis celular se sustentan en la aplicación de agentes que cortan o ejercen fuerzas que deforman la membrana o pared celular hasta causar su rompimiento, siendo los principales: presión mecánica, temperatura, ondas acústicas, microondas, y velocidad; en los métodos de lisis celular química se emplean sustancias químicas o enzimas que reaccionan con los componentes de la membrana o pared celular, lo cual generará el rompimiento de la célula. Finalmente, muchos protocolos de lisis celular emplean ambos principios para hacer más eficiente la obtención de orgánulos o metabolitos celulares.

1.2 Métodos mecánicos de lisis celular

1.2.1 Lisis celular por presión mecánica.

Para este tipo de lisis el elemento de laboratorio más utilizado es el mortero, el cual es un recipiente de cerámica de forma hueca y un pistilo o también llamado mango o mano. Su funcionamiento aparentemente es muy simple, ya que únicamente se pone la muestra que se desee lisar y posteriormente con el pistilo se comienza a golpear y triturar la muestra al aplicar presión.

Este tipo de lisis celular es uno de los procedimientos que más se utilizan en la Biología, ya que dependiendo de la presión y energía mecánica que se aplique a la muestra, se obtendrá un tipo de orgánulo específico. Por ejemplo, se ha determinado que en células animales el núcleo es el orgánulo más grande con respecto a los demás orgánulos, por lo tanto, al aplicar mucha presión en la lisis celular, no solo se lisarán las células, sino que también se incrementará la probabilidad de que el núcleo se rompa. Este efecto es perjudicial para protocolos que involucren en uso del núcleo celular, por el contrario, si el objeto de estudio fuese la purificación de orgánulos pequeños, como las mitocondrias o cloroplastos, la lisis del núcleo ayudará a tener un mejor resultado.

La lisis mecánica con mortero puede ser de dos formas en una se masera el tejido o células directamente y la otra se adiciona alguna solución cuya composición estará en función del orgánulo o biomoléculas que se desee purificar. Para este proceso muchos métodos incluyen un amortiguador como es el

amortiguador fisiológico denominado fosfatos y otros componentes que permiten mantener la estructura del orgánulo y/o actividad del metabolito que se desea purificar.

Puesto que la lisis celular por medio del mortero está en función de la presión que se aplica a las células o tejidos, para los que presentan pared celular o tejidos cuyas uniones celulares los hacen muy resistentes al daño mecánico, la lisis celular se efectúa colocando compuestos que facilitan la cristalización de las células o tejidos, siendo el nitrógeno líquido y el hielo seco los compuestos más utilizados para este fin. Algunos protocolos de lisis celular, además de los elementos antes mencionados, adicionan también perlas de vidrio de diferentes diámetros o tierra de diatomeas con el fin de llevar a lisis toda la pared y membranas de las células o tejidos de estudio.

Actualmente además del mortero, la lisis por métodos mecánicos se realiza también por medio de equipos eléctricos los cuales hacen girar un embolo que puede generar una presión sobre las células o tejidos. Por lo general el equipo que hace girar el émbolo permite intercambiar diferentes tamaños de émbolos y pueden utilizarse cuchillas las cuales generan de igual forma la lisis celular, para ambos casos los tejidos se encuentran en una solución con solventes orgánicos y/o detergentes.

Existen además otras dos opciones para la ruptura mecánica de las células la primera es la fragmentación por acción del

choque de esferas de vidrio con las células o el tejido. En este caso, las células o el tejido se introducen en un aparato que generará un movimiento vibratorio lo que genera el choque de las perlas con las células, lo que hace que se rompa la membrana o pared celular, en este tipo de lisis celular el tamaño de las esferas de vidrio varía dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, para bacterias y esporas se utilizan esferas de 0.1 mm en tanto que para levaduras, micelio, microalgas, células animales o células tratadas con la enzima tripsina se utilizan esferas de 0.5 mm. Para tejidos como cerebro, musculo, piel u hojas, las esferas son de 1-2.5 mm.

Otro tipo de lisis celular es la sonicación, la cual se sustenta en la generación de ondas acústicas generalmente ultrasónicas que rompen las membranas y la pared celular por medio de un fenómeno llamado cavitación. En este tipo de lisis celular cuando las células o tejidos están inmersas en un medio líquido al cual se le introduce un elemento que produce ondas ultrasónicas estas generarán burbujas microscópicas, las cuales al expandirse y colapsarse con las células transmitirá su energía produciendo así la lisis celular.

1.2.2 Lisis celular por temperatura

Este tipo de lisis celular es muy utilizado en microbiología o para organismos unicelulares eucariontes. Dentro de este tipo de procesos se encuentra la congelación, la ebullición o la mezcla de ambos. Estos dos últimos procedimientos son muy sencillos,

ya que se fundamentan en calentar las células o tejidos a altas temperaturas por un tiempo determinado hasta generar la lisis celular. En otros casos el incremento de la temperatura es por tiempos cortos y de forma inmediata se coloca la muestra a temperaturas que permitan la congelación. El proceso se repite varias veces con el fin de romper la membrana y/o pared celular.

1.3 Lisis celular por métodos químicos y enzimáticos

La lisis celular por métodos químicos se da por el uso de agentes quelantes como el EDTA, que atrapan cationes haciendo que la membrana celular se debilite, agentes caotrópicos que favorecen la disolución de proteínas de la pared celular ocasionando su ruptura. Además, el uso de enzimas como la lisozima, que permeabiliza de forma selectiva la membrana, también es uno de los métodos utilizados para la lisis celular. Para este procedimiento es indispensable que los reactivos que generaran la lisis sean disueltos en un medio líquido que favorezca la reacción del reactivo con los componentes celulares o que mantenga la integridad de los orgánulos, es por ello que los reactivos pueden disolverse generalmente en agua o amortiguadores como es el amortiguador fosfato.

ANEXO 4

LINEAMIENTOS PARA LA ENTREGA DE INFORMES DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR

Un informe de laboratorio, es por definición, el único medio de comunicar a la comunidad científica (y a su profesor) el resultado de su trabajo experimental. El informe debe de contener todas las informaciones necesarias para que cualquier persona pueda repetir sus experimentos. Por lo tanto, sus informes deben de reflejar esta intención. Es evidente entonces, que cualesquiera que sean los resultados finales el informe debe de estar redactado en términos claros y de manera legible. El informe debe de estar constituido de:

i. Introducción.

En ella se presenta brevemente el problema de estudio, a menudo en relación con los datos ya existentes en la literatura. En caso de que las prácticas propuestas ya contengan una introducción teórica importante (guías de laboratorio), usted puede referirse a ellas sin más. Sin embargo, los elementos esenciales deben de ser mencionados.

ii. Materiales y métodos.

En un informe normalmente destinado a una publicación, es tal vez el capítulo más importante, ya que es el único medio dado a los demás para repetir y confirmar (o invalidar) sus resultados. Este capítulo corresponde a la estructura clara de las notas prácticas tomadas durante la realización de la experiencia. La descripción de las experiencias y su protocolo debe de ser breve pero clara.

ii. Resultados.

Se presentan en ellos los resultados obtenidos. Todos los medios son buenos: tablas de cifras, gráficos, histogramas, fotos, etc., y textos si es necesario. Un cuidado particular debe tenerse sobre la mención de las unidades utilizadas (que se sepa de qué se habla). Un resultado experimental correcto, pero mal presentado o descrito, equivale para una persona que no haya hecho el experimento con usted, a un resultado artificial (dicho coloquialmente, "sacado de la manga") y será tratado como tal (tanto para el editor de la revista como para su profesor). Los resultados deben de estar acompañados de un comentario ilustrativo de su propio significado y sus relaciones con otros resultados.

iv. Discusión y Conclusiones.

Es allí donde se evalúa la significación de los resultados con relación a las hipótesis formuladas en la introducción o en relación con el problema del experimento. Igualmente, donde se propone la explicación de los fenómenos observados. Finalmente, donde se comparan los resultados obtenidos con los publicados en la literatura sobre un problema similar.