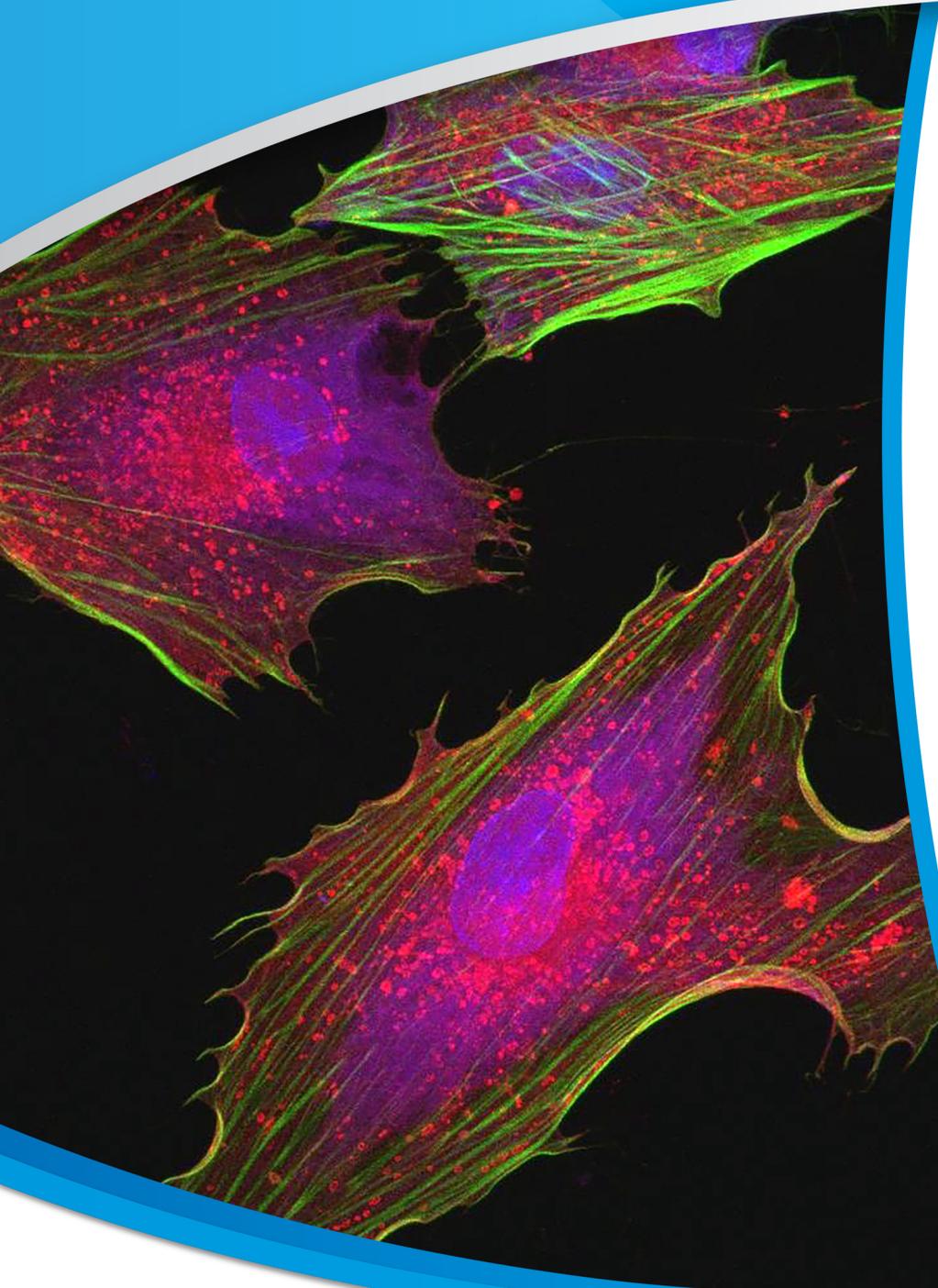




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Estructura y Función Celular II



Leticia **Bucio Ortíz**

Verónica **Souza Arroyo**

Viridiana **González Puertos**

Noé **Salinas Arreortua**

Eduardo **Casas Hernández**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2015
ISBN: 978-607-28-0457-9

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Introducción	5
Normas de seguridad en el laboratorio	7
Práctica 1 Permeabilidad celular	9
Práctica 2 Obtención y caracterización de colágena	15
Práctica 3 Glucocálix	21
Práctica 4 Pared celular	27
Práctica 5 Respiración mitocondrial	31
Práctica 6 Extracción de los pigmentos en tejido vegetal y su separación cromatográfica ...	37
Práctica 7 Fotosíntesis: demostración de la tasa de fotosíntesis, empleando discos de hoja	43
Práctica 8 Obtención y determinación cuantitativa del ácido desoxirribonucleico	51
Práctica 9 Mitosis	57
Práctica 10 Meiosis en célula vegetal	63

Introducción

El presente manual de laboratorio, responde a las necesidades de llevar a la práctica los temas considerados en la Unidad de Enseñanza aprendizaje (UEA): Estructura y Función Celular II (clave 2341093), la cual comprende 4 h de teoría y 3 h de sesión práctica por semana. Dicha UEA es de tipo obligatorio para las licenciaturas de Biología Experimental, Biología e Hidrobiología y optativa para las otras licenciaturas de la Unidad Iztapalapa y aprobada por el Colegio Académico de la UAM, en su sesión 344 del 13 de Abril del 2012.

Las diez prácticas de laboratorio del presente manual, cubren en un 100% los temas teóricos de esta UEA, se han realizado y probado en los laboratorios de la DCBS, de la UAM-Iztapalapa y permiten la participación activa de los alumnos para reforzar los conocimientos vistos en la clase teórica.

Práctica 1. Permeabilidad celular

La permeabilidad selectiva de la membrana plasmática juega un papel fundamental en las células, ya que el intercambio de sustancias entre ésta y el medio es esencial para el funcionamiento adecuado y homeostasis celular. En esta práctica se presentan 2 modelos de membrana, uno *in vivo* y otro *in vitro*, que permitirá al alumno darse cuenta de cómo actúan dinámicamente las membranas, tanto microscópica (eritrocitos) como macroscópicamente (condón de látex).

Práctica 2. Obtención y caracterización de colágena

Las colágenas forman parte de la familia de las proteínas fibrosas de la matriz extracelular, su principal función es la de soporte estructural y celular. Por ello la importancia biológica de la colágena es muy significativa y en esta sesión práctica el procedimiento que se plantea para la extracción de esta proteína es muy sencillo a partir de crestas de pollo. Debido al alto contenido de prolina que contiene la colágena en su estructura es posible identificarla por una reacción colorida.

Práctica 3. Glucocáliz

Permite de una manera rápida y sencilla, determinar el tipo sanguíneo de cada uno de los alumnos, al observar una respuesta positiva mediante la aglutinación de células sanguíneas al reaccionar con antisueros, A, B, o D. Esta aglutinación es el resultado de la interacción que ocurre entre los antígenos de membrana que forman el glucocáliz y que son específicos de cada persona y los sueros agregados.

Práctica 4. Pared celular

Con esta práctica el alumno tendrá una enseñanza activa, participativa e individualizada, donde además de promoverse el método científico aplicará un espíritu crítico. También aprenderá cuales son los componentes de la pared celular en células vegetales, así como su papel y funcionalidad tanto en tejidos desarrollados (como el caso de epidermis de cebolla) o en tejidos de tipo meristemáticos (raíz de frijol o haba) mostrando el desarrollo de esta estructura desde sus diferentes estadios.

Práctica 5. Respiración mitocondrial

Esta práctica tiene como finalidad fundamental promover el aprendizaje de forma significativa, ya que en ella se pueden integrar aspectos de ciencia básica y el método científico. El estudio de la respiración mitocondrial es fundamental ya que es un proceso indispensable para la síntesis de energía necesaria para la supervivencia celular, permitiendo que los alumnos visualicen las consecuencias al haber un mal funcionamiento en algunos de los complejos proteínicos que conforman la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, los cuales tienen un papel importante en la funcionalidad de órganos y tejidos de los organismos.

Práctica 6. Extracción de los pigmentos en tejido vegetal y su separación cromatográfica

El objetivo de esta práctica es el de fomentar la enseñanza y conocimiento en ciencia básica. La práctica permite que los alumnos adquieran el conocimiento y observen mediante la cromatografía en papel la presencia de los diferentes pigmentos fotosintéticos en el tejido vegetal, los cuales están encargados de la captación de la energía solar, ya que la fotosíntesis es el principal medio de fijación de carbono y la principal fuente de oxígeno en la atmósfera terrestre.

Práctica 7. Fotosíntesis

En la fase luminosa de la fotosíntesis, se utiliza la luz para generar ATP y reducir al NADP^+ a NADPH, que son empleados en la fase oscura (ciclo de Calvin) para fijar CO_2 y producir glucosa. Además, se produce O_2 como subproducto de la fotólisis del agua en la cadena de transporte de electrones que ocurre en el cloroplasto de las células del mesófilo de las hojas verdes.

Práctica 8. Obtención y determinación cuantitativa del ácido desoxirribonucleico

La molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) contiene toda la información genética de un organismo. Esta molécula está constituida por dos largas cadenas polinucleotídicas antiparalelas unidas entre sí formando una doble hélice que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno al aparearse por la complementariedad entre las bases nitrogenadas. La extracción de DNA de hígado de pollo es a través de una técnica sencilla. Las desoxipentosas presentes en la estructura del DNA, permiten estimar su contenido mediante una reacción colorida.

Práctica 9. Mitosis

La mitosis es el proceso de división de las células somáticas ya sea de tipo vegetal o animal, en el cual a partir de una célula madre se producen dos células hijas idénticas en cantidad y tipo de DNA. En esta práctica se toma como modelo estudiar las diferentes fases de la mitosis en células de tipo vegetal, en el meristemo apical de raíz de cebolla, haba, frijol u otra semilla que se disponga. Mediante el uso de un agente mitostático es posible incrementar la probabilidad de observar células y cromosomas en metafase, en comparación a células en interfase.

Práctica 10. Meiosis en célula vegetal

La meiosis es el proceso de división de las células germinales ya sea de tipo vegetal o animal, en el cual a partir de una célula madre se producen cuatro células hijas conteniendo la mitad del material genético. El modelo que se utilizará son botones florales de plantas en primeras etapas de desarrollo, debido a su fácil disponibilidad se sugiere hacerlo en el género *Gibasis* u otras accesibles. En esta práctica, al emplear las anteras inmaduras es posible obtener células que se encuentran realizando alguna de las 2 divisiones meióticas, las que pueden presentar 2 núcleos o bien formar tétradas, así como observar sus cromosomas en las diferentes fases: profase, metafase, anafase o telofase.

Normas de seguridad en el laboratorio

El laboratorio es un lugar donde se manipulan una gran cantidad y variedad de productos peligrosos. Con el fin de evitar accidentes como incendios, explosiones, intoxicaciones y quemaduras, se han establecido una serie de normas básicas de seguridad y precaución para evitar riesgos.

- Es obligatorio el uso de bata y lentes de seguridad.
- Al realizar cada una de las prácticas, el alumno debe estar informado de las medidas de seguridad, así como del manejo y toxicidad de los reactivos.
- Es preciso identificar en el lugar, la localización de los extinguidores, las regaderas y las salidas de emergencia del laboratorio.
- Queda prohibido fumar e ingerir alimentos y bebidas dentro del laboratorio.
- Debe revisarse el material de vidrio para comprobar posibles fisuras, especialmente antes de su uso.
- Asegurar el enfriamiento del material que se ha calentado antes de sujetarlo con la mano.
- Queda prohibida la visita de personas ajenas a la práctica que se realiza.
- La transferencia de un líquido con pipeta nunca ha de realizarse succionando con la boca, sino que deberá utilizar perilla de hule.
- Los productos y reactivos químicos que puedan desprender vapores tóxicos o corrosivos, deben ser manipulados en las campanas extractoras y los solventes orgánicos nunca cerca de una flama.
- No dejar en las mesas de laboratorio frascos destapados. Muchas sustancias líquidas (alcohol, éter, cloroformo, amoníaco, etc.) emiten vapores tóxicos.
- Lavarse siempre las manos después de realizar la práctica y antes de salir del laboratorio.
- Es imprescindible el uso de guantes cuando se manipulan sustancias tóxicas o biológicas, y recomendable cuando se trabaja con sustancias corrosivas e irritantes. Cualquier quemadura con ácido, o base, requiere que se ponga la parte afectada bajo el chorro de agua fría durante 15 minutos y comunicarlo de inmediato al profesor.
- En el laboratorio existen contenedores debidamente etiquetados donde se introducirán en su caso, los residuos generados ya sean químicos o biológicos, para ser inactivados o incinerados.

En caso de tener que evacuar el laboratorio, cerrar la llave del gas y salir de forma ordenada siguiendo en todo momento las instrucciones que haya impartido el profesor.

Práctica 1

Permeabilidad celular

Introducción

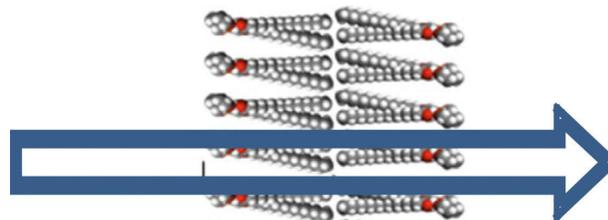
Para llevar a cabo las reacciones químicas necesarias en el mantenimiento de la vida, la célula necesita mantener un medio interno apropiado. Esto es posible porque las células se encuentran separadas del mundo exterior por una barrera limitante, la membrana plasmática. Además, la presencia de membranas internas en las células eucariotas proporciona compartimientos adicionales que limitan ambientes únicos en los que se llevan a cabo funciones altamente específicas, necesarias para la supervivencia celular.

El papel fundamental de las membranas es asegurar la separación metabólica y química permitiendo que haya una composición distinta a concentraciones diferentes en los espacios delimitados. Por otra parte, es importante señalar que no se pueden construir barreras impermeables absolutas, porque la vida celular y el funcionamiento de los organelos requieren intercambios continuos y controlados de materia, energía e información.

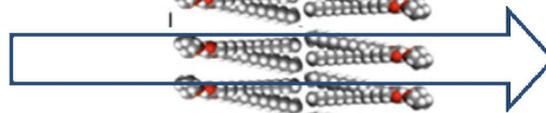
Estas membranas biológicas están compuestas por proteínas asociadas a una matriz constituida por una bicapa lipídica. Sus fracciones lipídicas consisten en mezclas complejas que varían según el origen de las membranas.

La principal característica de la membrana plasmática es su permeabilidad selectiva, lo que le permite seleccionar las moléculas que deben entrar y salir de la célula. De esta forma se mantiene estable el medio intracelular, regulando el paso de agua, iones y metabolitos, a la vez que mantiene el potencial electroquímico.

Moléculas hidrofóbicas y gases.



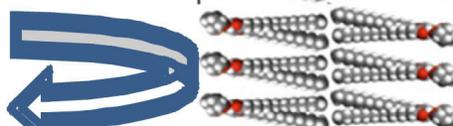
Moléculas pequeñas con carga.



Moléculas grandes con carga.



Iones.



Así mismo, las membranas semipermeables presentan el fenómeno en el que se produce el paso o difusión de un disolvente a través de una membrana semipermeable (permite el paso de disolvente pero no de solutos) desde la disolución más diluida a la más concentrada. Los medios acuosos separados por una membrana semipermeable pueden tener diferentes concentraciones, y se denominan:

- Hipertónicos: son los que poseen una elevada concentración de solutos con respecto a otros en los que la concentración es inferior.
- Hipotónicos: son los que contienen una concentración de solutos baja con respecto a otros que la poseen superior.
- Isotónicos: son los que poseen una concentración de solutos igual a la concentración interna de la célula.

Objetivo general

- Observar el comportamiento de las diferentes membranas biológicas y no biológicas en relación a su permeabilidad a distintos medios acuosos.

Objetivos particulares

- Observar el comportamiento de las células vegetales y animales frente a medios acuosos con diferente concentración de soluto.
- Observar el fenómeno de la permeabilidad en una membrana artificial.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Vaso de precipitados de 500 mL.
- 1 Microscopio de campo claro.
- 3 Vidrios de reloj.
- Papel seda.
- Lanceta.
- 3 Pipetas Pasteur.
- 1 Pipeta con etanol.
- 1 caja de portaobjetos.
- 1 caja de cubreobjetos.

Proporcionado por el alumno

- Etiquetas adheribles.
- Hilo.
- Condón (distinta marca por equipo).
- Elodea.
- Algodón.

Reactivos

- Fenolftaleína.
- Yodo.
- Yoduro de potasio.
- Alcohol etílico.
- Hidróxido de amonio.
- Almidón.
- NaCl.

Soluciones

- NaCl 0.15 M (5 mL).
- NaCl 0.075 M (5 mL).
- NaCl 0.3 M (5 mL).
- Lugol: disolver 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 25 mL de agua destilada, cuando se haya disuelto completamente agregar 75 mL de agua destilada para obtener 100 mL.
- Fenolftaleína (1% P/V). Pesar 1 g de fenolftaleína y disolver en 50 mL de alcohol etílico, y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Almidón con hidróxido de amonio. Pesar 100 g de almidón y agregarlos a 450 mL de agua destilada y adicionar 50 ml de hidróxido de amonio.

Procedimiento experimental

A. Membranas biológicas (*estudio microscópico*)

- *Células animales.*

Nota: La obtención de la muestra biológica (sangre) deberá realizarse bajo las condiciones de higiene y seguridad que implican el manejar material biológico: trabajar en un área limpia y específica, no tener contacto directo con la muestra biológica, todos los materiales de desecho que contengan sangre (algodón, lanceta, papel, palillos de madera, etc.) deberán ser depositados en un contenedor especial para ser incinerados.

1. Con una lanceta estéril picar la yema del dedo anular y depositar una gota de sangre en un vidrio de reloj perfectamente limpio y etiquetado que contenga 2 mL de la solución de NaCl 0.15 M, dejar reposar durante un minuto.
2. Con ayuda de una pipeta Pasteur colocar una gota de esta suspensión celular en un portaobjetos, después colocar un cubreobjetos y observar al microscopio. Enfocar con el objetivo de 10X, pasar al objetivo de 40X, y finalmente al de 100X para hacer observaciones.
3. Repetir el mismo procedimiento con la solución de NaCl 0.075 M, y con la de 0.3 M.
4. Obtener fotografías y/o realizar las representaciones en cada aumento.

- *Células vegetales.*

1. En un vidrio de reloj que contenga 2 mL de la solución de cloruro de sodio 0.15 M, depositar una hoja de elodea y dejarla reposar de 2 a 3 min. Posteriormente colocar la hoja en un portaobjetos, poner un cubreobjetos y observar al microscopio.
2. Repetir el mismo procedimiento con la solución de NaCl 0.075 M, y con la de 0.3 M.
3. Obtener fotografías y/o realizar las representaciones en cada aumento.

B. Membrana artificial (*estudio macroscópico*)

1. Lavar el condón con agua de la llave y luego, con agua destilada.
2. Agregar 25 mL de la solución de almidón con hidróxido de amonio dentro del condón y cerrar con un hilo (Realizar en campana de extracción).



3. Colocar el condón dentro de un vaso de precipitado de 500 mL que contenga 2 /3 de agua destilada y 5 gotas de fenolftaleína durante 30 minutos. Observar si cambia el color del agua.
4. Abrir el condón y agregar 4 gotas de la solución de lugol, observar si cambia el color de la solución de almidón.
5. Agregar 4 gotas de lugol al agua del vaso de precipitado y comparar con la coloración observada en el punto anterior.

Resultados

1. Esquematizar el comportamiento de las células animal y vegetal frente a las diferentes concentraciones de NaCl.
2. De acuerdo a las observaciones, elaborar una tabla donde se indique el tipo celular, la concentración salina a la que estuvo expuesta y las características que se observan en ellas.
3. Indicar los cambios observados en el agua del vaso de precipitado y en la solución dentro del condón.

Análisis de resultados

Nota: Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

- Decir cuál fue el propósito al colocar las células en una solución isotónica.
- Mencionar las diferencias observadas entre las células animal y vegetal en presencia de la solución hipotónica e hipertónica y explicar el mecanismo implicado en los cambios morfológicos.
- Señalar cuáles sustancias utilizadas (almidón, hidróxido de amonio y fenolftaleína) atravesaron la membrana de látex del condón y cómo se demostró que ocurrió.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario Previo

1. Mencionar, qué es una solución isotónica, hipotónica e hipertónica y qué efecto tienen en las células.
2. Mencionar qué es y cuál es la función de los siguientes componentes:
 - a. Almidón.
 - b. Hidróxido de amonio.
 - c. Lugol.
 - d. Fenoltaleína.

Bibliografía

-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la célula. 5ª. ed. Omega. España.
-  Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni P. 2009. The world of the cell. Seventh ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos. McGraw Hill. México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Carmel JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. México.

Práctica 2

Obtención y caracterización de colágena

Introducción

La colágena es la proteína más abundante del organismo y el componente básico de la piel, huesos, ligamentos, tendones y cartílagos. Su principal función es proporcionar integridad estructural, como parte de la matriz extracelular.

Se conocen aproximadamente 28 tipos de colágenas que se diferencian en su secuencia de aminoácidos y sus diferentes funciones. De acuerdo a la forma en que se agregan, se han clasificado como fibrilares I, II, III, V y XI y no fibrilares VI, VII, VIII, y X.

Como todas las proteínas, la colágena está constituida por cadenas de residuos de aminoácidos, y posee dos características que la hacen única:

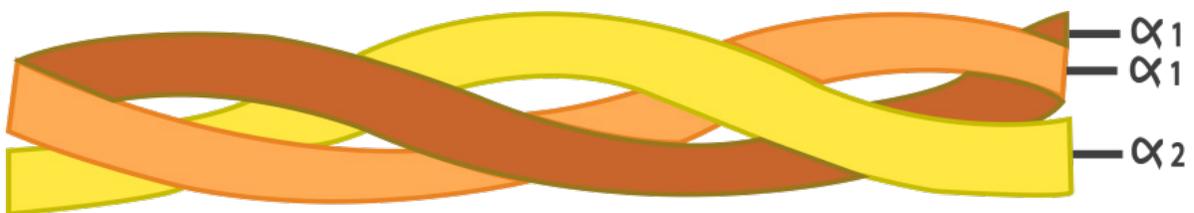
- Su composición presenta un alto contenido de los aminoácidos glicina y prolina, siendo la única proteína que puede tener las formas hidroxiladas de la prolina y la lisina.
- La colágena es una proteína fibrilar, con una estructura muy larga y compleja.
- Se forma a partir de dos cadenas $\alpha 1$ y una $\alpha 2$, que se enrollan y se enlazan formando la llamada triple hélice de tropocolágeno.

Los tropocolágenos se enlazan por sus extremos, formando largas hileras que, a su vez, se alinean paralelamente uniéndose para formar las microfibrillas, que son estabilizadas por puentes de hidrógeno, entre las hidroxiprolinas.

Estas microfibrillas también se alinean y se unen en paralelo para formar las fibrillas, las cuales dan origen a las fibras. Son estas fibras de colágena las que aportan su gran resistencia y elasticidad a los tejidos.

Cuando la colágena se somete a un tratamiento con ácidos, estas estructuras en paralelo se van desmontando hasta que las triples hélices se desenrollan y se rompen parcialmente, dando lugar al hidrolizado de colágena. Por lo tanto, la extracción de la colágena se puede realizar a partir de ácidos débiles como el ácido acético diluido.

Además, por el alto contenido de prolina e hidroxiprolina que presenta la colágena en su estructura permite poder identificarla mediante una reacción con ninhidrina. Todos los aminoácidos que poseen un grupo amino libre forman un producto color azul o púrpura cuando son calentados en presencia de ninhidrina y en el caso de la prolina, que estructuralmente no posee el grupo amino libre, sino un grupo imino, la coloración final es amarilla.



Representación esquemática de la triple hélice de la colágena.

Objetivo general

- Extraer la colágena de cresta de pollo e identificarla por un método colorimétrico.

Objetivos Particulares

- Extraer la colágena a partir de crestas de pollo.
- Identificar a la colágena mediante un método colorimétrico.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Embudo.
- 1 Probeta de 50 mL.
- 2 Vasos de precipitados de 100 mL.
- 1 Vaso de precipitados de 250 mL.
- 1 Parrilla de calentamiento.
- 1 Centrifuga.
- 1 Bisturí.
- 1 Pinza.
- 2 Tubos de centrifuga de 50 mL.
- 1 Piceta con agua destilada.
- 1 Agitador magnético.
- 1 Espátula.
- 4 Tubos de ensayo de vidrio de 16 x 150 mm.
- 2 Pipetas graduadas de 5 mL.
- 1 Pipeta graduada de 10 mL.
- 1 Pipeta graduada de 2 mL.
- 1 Gradilla.
- 1 Balanza de dos platos.

Material proporcionado por los alumnos

- 10 g de crestas de pollo.
- 4 Bolsas de gasa.
- 1 Papel aluminio.

Reactivos

- Etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Prolina.
- Ácido glutámico.

Soluciones

- Etanol al 20%. (250 mL).
- NaOH 2 M. (250 mL).
- Ácido acético 0.5 M. (250 mL).
- NaCl 5 M. (25 mL).
- Solución de prolina al 0.5%, pH 6.0. (10 mL).
- Solución de ácido glutámico al 0.5%, pH 6.0. (10 mL).
- Reactivo de ninhidrina al 2% en acetona. (20 mL).
- Albúmina 10 mg/ml (10 mL).

Procedimiento Experimental

A. Extracción de colágena

1. Lavar las crestas de pollo con agua destilada y secarlas con gasa.
2. Pesar 10 g de crestas de pollo en un papel aluminio y tomarlas con la pinza para fragmentarlas en pequeños trozos con el bisturí.
3. Colocarlas en un vaso de precipitados de 100 mL y agregarle 25 mL de etanol al 20%, poner en agitación constante por 10 min a temperatura ambiente.
4. Decantar y desechar el etanol con la ayuda de la espátula.
5. Adicionar a las crestas 25 mL de la solución de NaOH 2M y dejar en agitación por 10 min a temperatura ambiente.
6. Decantar y desechar la solución de NaOH con la ayuda de la espátula.
7. Añadir a las crestas 25 mL de ácido acético 0.5 M y dejar en agitación por 10 min a temperatura ambiente.
8. Filtrar a través de dos capas de gasa con ayuda del embudo de vidrio, recuperando el filtrado en un vaso de precipitados de 100 mL.
9. Adicionar al filtrado 2 mL de la solución de NaCl 5M lentamente y transferirlo a un tubo de centrifuga.
10. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
11. Disolver el botón en 10 mL de agua destilada.
12. Tomar una alícuota de colágena para realizar la identificación.

B. Identificación de la colágena

1. Disponer de una serie de tubos de ensayo y agregar los reactivos como se indica en la siguiente tabla.

Reactivos	Tubo No.			
	1	2	3	4
Prolina (mL)	1.0	-	-	-
Ácido glutámico (mL)	-	1.0	-	-
Albúmina (mL)	-	-	1.0	-
Muestra de colágena (mL)	-	-	-	1.0

2. Adicionar 0.5 mL del reactivo de ninhidrina a cada tubo y taparlo con papel aluminio.
3. Incubar todos los tubos en baño de agua hirviendo durante 2 minutos.
4. Dejar enfriar y observar que color se produjo en cada uno de los ensayos.

Resultados

1. Hacer una tabla de referencia de colores para cada una de las muestras.
2. Indicar si su muestra contiene colágena.
3. Comparar el color obtenido en la muestra de colágena con la de los aminoácidos y la albúmina.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Con base a las observaciones explicar a qué se debe el color obtenido en la muestra de colágena y de la albúmina.
- Indicar qué tipo de molécula es la ninhidrina y por qué se puede utilizar para identificar a la colágena.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario Previo

1. Mencionar los elementos que constituyen a la matriz extracelular.
2. Investigar el papel fisiológico de la colágena.
3. Explicar cuál es la función del ácido acético en la técnica.
4. Describir la reacción química entre la ninhidrina con el ácido glutámico y con la prolina.

Bibliografía

-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la célula. 5ª ed. Omega. España.
-  Brodsky B, Persikov AV. 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 70:301–39.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Darnell JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Mathews C, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell WW. 2004. Bioquímica de Harper, 16ª ed. Manual Moderno. México.
-  Shoulders MD, Raines RT. 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 78:929-58.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.

Práctica 3

Glucocálix

Introducción

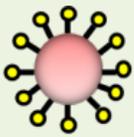
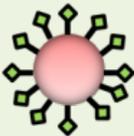
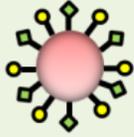
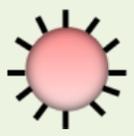
El glucocálix, se refiere a la zona que rodea a la célula que es rica en carbohidratos (oligosacáridos), llegando a representar de 2-10% del peso de la membrana. Los oligosacáridos se encuentran unidos a proteínas o lípidos de la membrana, formando glucoproteínas con numerosas cadenas laterales de oligosacáridos, y glucolípidos, con tan sólo una.

La especificidad antigénica de una célula radica en los pequeños oligosacáridos que pueden estar ligados a una larga cadena peptídica o a una esfingomielina, como la ceramida.

Las células sanguíneas contienen un gran número de determinantes antigénicos, debido a los cuales es posible la clasificación del grupo sanguíneo. Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos (el sistema ABO) y el factor Rh. Por lo tanto, los sistemas antigénicos considerados más importantes son el sistema ABO y el sistema Rh (aunque en la actualidad se han determinado hasta 32 sistemas antigénicos).

Las personas con sangre del tipo A tienen glóbulos rojos que expresan antígenos de tipo A en su superficie y anticuerpos contra los antígenos B en el plasma de su sangre. Las personas con sangre del tipo B tienen glóbulos rojos con antígenos de tipo B en su superficie y anticuerpos contra los antígenos A en el plasma de su sangre. Los individuos con sangre del tipo O ó 0 (cero) no expresan ninguno de los dos antígenos (A o B) en la superficie de sus glóbulos rojos pero tienen anticuerpos contra ambos tipos, mientras que las personas con tipo AB expresan ambos antígenos en su superficie y no producen ninguno de los dos anticuerpos.

La determinación del grupo sanguíneo se basa en una reacción inmunológica. Cuando una muestra de sangre con eritrocitos que contienen en la membrana antígenos A, y/o B, reacciona con suero o una solución que contiene anticuerpos B y/o A, se aglutina, el tipo sanguíneo será A, B ó AB. O bien, si la reacción inmunológica no ocurre no habrá aglutinación, lo cual corresponderá al tipo sanguíneo O.

	Células sanguíneas	Anticuerpos	Antígenos
Grupo A		 Anti-B	 Antígeno A
Grupo B		 Anti-A	 Antígeno B
Grupo AB		Ninguno	 Antígeno A y B
Grupo O		 Anti-A y Anti-B	Ningún Antígeno

Representación esquemática de los antígenos de superficie en los eritrocitos.

Objetivo general

- Establecer la participación del glucocáliz en la determinación del grupo sanguíneo.

Objetivos particulares

- Observar la reacción inmunológica debida a los carbohidratos de los antígenos con anticuerpos específicos a través de la aglutinación.
- Determinar el tipo de sanguíneo de cada alumno, observando si hay o no aglutinación de sus eritrocitos.
- Establecer un porcentaje de la frecuencia para cada grupo sanguíneo, tomando como muestra el total de alumnos.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

1 Microscopio óptico de campo claro.

1 Caja de portaobjetos.

1 Caja de cubreobjetos.

1 Lanceta estéril por alumno.

1 Piceta con alcohol.

Torundas de algodón.

1 Micropipeta de 20-200 μ L.

Puntas para micropipeta.

Material proporcionado por los alumnos

1 Caja de palillos de madera.

Reactivos

- Etanol.
- Antisuero anti-A.
- Antisuero anti-B.
- Antisuero anti-D.

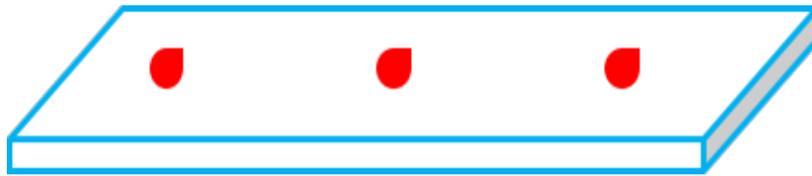
Soluciones

- Etanol al 70%.

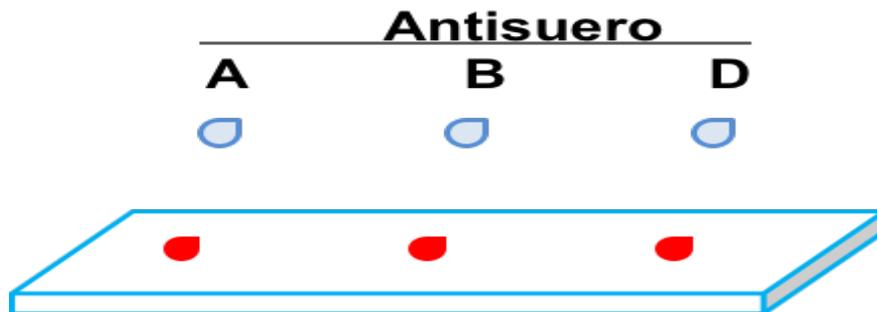
Procedimiento experimental

Nota: La obtención de la muestra biológica (sangre) deberá realizarse bajo las condiciones de higiene y seguridad que implican el manejar material biológico: trabajar en un área limpia y específica, no tener contacto directo con la muestra biológica, todos los materiales de desecho que contengan sangre (algodón, lanceta, papel, palillos de madera, etc.) deberán ser depositados en un contenedor especial para ser incinerados.

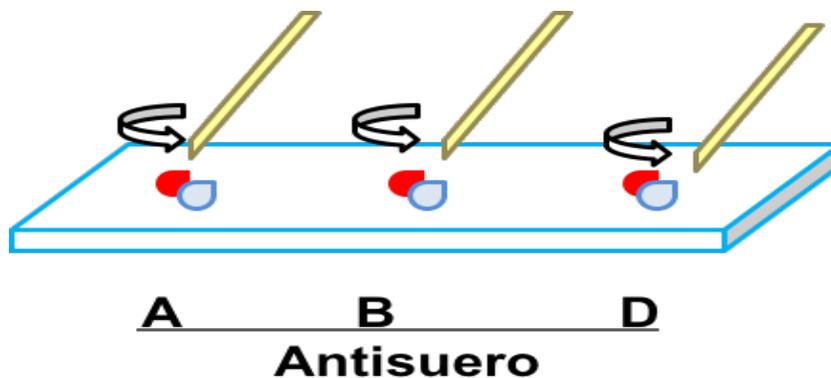
1. Limpiar el extremo del dedo anular con una torunda de algodón impregnada de alcohol.
2. Oprimir la punta del dedo anular, para que la presión permita que se ponga morado y pueda obtenerse más rápido la muestra de sangre.
3. Con la lanceta estéril, picar la yema del dedo y colocar 3 pequeñas gotas de sangre en puntos equidistantes en el portaobjetos.



4. A cada una de las gotas de sangre y por separado, agregar 25-50 μ L de antisuero A, antisuero B y antisuero D, evitar que se mezclen las gotas de sangre entre sí. Tener cuidado de usar una punta limpia para cada solución.



5. Con un palillo diferente para cada muestra, mezclar y homogenizar la sangre y el suero.



6. Esperar durante dos minutos y realizar las observaciones (identificar si hay o no aglutinación).

7. Realizar observaciones en el microscopio óptico, con los objetivos de 10X, 40X y 100X.
8. Capturar las imágenes y realizar la interpretación de la interacción de los eritrocitos con cada uno de los anticuerpos.

Resultados

1. Indicar observaciones a nivel macroscópico y microscópico. Realizar imágenes y si es posible tomar fotos de los resultados observados.
2. Elaborar una tabla, indicando el nombre del integrante del equipo y el tipo sanguíneo que presentó.
3. Indicar en una tabla cuantos alumnos del grupo de EFC-II, presentaron el tipo sanguíneo A, B, AB, O y Rh⁺.
4. Elaborar una gráfica (histograma) donde se indique el porcentaje de alumnos que presentaron cada uno de los grupos sanguíneos.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Con base en sus observaciones, explicar qué es la aglutinación y qué indica.
- ¿Qué son los antisueros A, B y D, cuál es su reacción ante las células sanguíneas y que indica la aglutinación?
- Describir qué tipo sanguíneo es el que se encuentra en mayor proporción e investigar a qué se debe este hecho.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario previo

1. Definir los siguientes términos:
 Glicoproteína.
 Receptor.
 Ligando.
 Antígeno.
 Anticuerpo.
 Lectina.
2. ¿Qué tipo de monosacáridos se encuentran conformando los oligosacáridos de las glicoproteínas del glucocálix?
3. ¿Cuáles son los antígenos específicos que definen el tipo sanguíneo?

Bibliografía

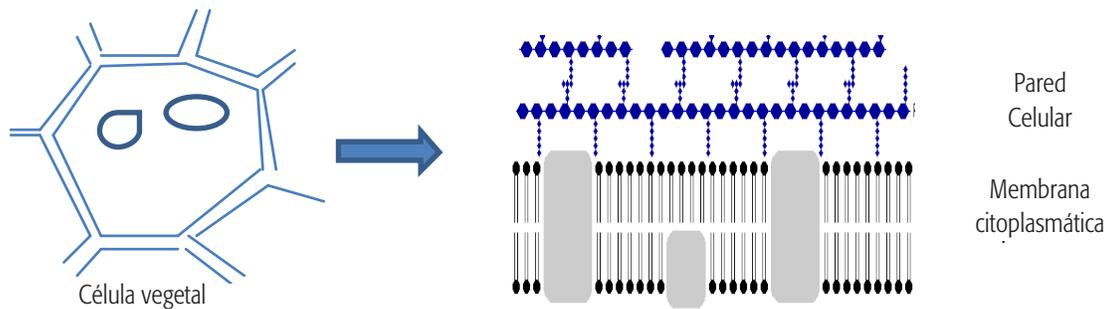
-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la célula. 5ªed. Omega. España.
-  Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni GP. 2009. The world of the cell. Seventh ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  Cotorruelo CM, Biondi CS, García Borrás S, Racca AL. 2002. Clinical aspects of Rh genotyping. Clin Lab. 48; (5-6:271-81.
-  Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV. 1980. Manual de Inmunología clínica. 2ª ed. El Manual Moderno. México.
-  Gasimli L, Linhardt RJ, Dordick JS. 2012. Proteoglycans in stem cells. Biotechnol Appl Biochem. 59; 2:65-76.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott, MP, Zipursky SI y Darnell JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.

Práctica 4

Pared celular

Introducción

Las células vegetales están rodeadas por una pared relativamente delgada, pero mecánicamente fuerte de la que carecen las células animales. Sin embargo, las paredes celulares no son exclusivas de las plantas, también se encuentra en las células procariontas de *Eubacteria* y *Archaeobacteria* y las del reino fungi, las cuales también están rodeadas por pared celular, con una composición química diferente. En células vivas las paredes tienen un papel importante en actividades como absorción, transpiración, translocación, secreción y reacciones de reconocimiento.



La pared celular en vegetales está constituida por: un componente cristalino o porción fibrosa (esqueleto) y un componente amorfo o matriz no fibrosa, altamente hidratado, semejante a un gel. Esta estructura se parece a la de la fibra de vidrio y de otros materiales compuestos, en los cuales las fibras cristalinas rígidas se usan para reforzar la matriz y hacerla más flexible.

Componente cristalino. Está representado por las cadenas celulósicas que pueden alcanzar 4 μm de longitud. Estas son cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces covalentes 1-4 β , que debido a la alterna configuración espacial de las cadenas glucosídicas, la unidad repetitiva de la celulosa es la celobiosa, un disacárido 1-4 β -D glucosa, dispuestas de modo ordenado mediante enlaces puentes de hidrógeno, formando una estructura cristalina (que contiene algunas regiones no cristalinas).

Por otra parte, las células meristemáticas presentan las características citológicas de las células indiferenciadas y son las responsables del crecimiento permanente de las plantas y están presentes durante toda la vida de éstas. Las células meristemáticas muestran las características citológicas de las células indiferenciadas, son pequeñas, isodiamétricas y tienen una pared celular primaria delgada.

Objetivo general

- Identificar la pared celular que conforma a las células vegetales tanto en epidermis de cebolla como en tejido meristemático.

Objetivos particulares

- Reafirmar los conocimientos sobre el uso del microscopio.
- Observar la pared celular en diferentes tipos de células.

Hipótesis

- Generada por el alumno.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Microscopio.
- 1 Caja de portaobjetos.
- 1 Caja de cubreobjetos.
- 1 Vidrio de reloj.
- 1 Pinza de disección.

Proporcionado por el alumno

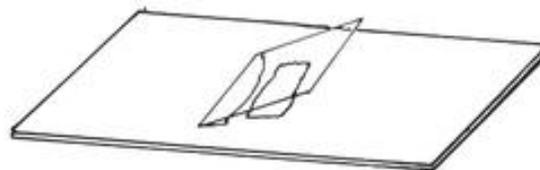
- 1 Hoja de afeitar.
- 1 Cebolla.
- Radícula de embriones (frijol, haba).

Reactivos

- Azul de metileno.

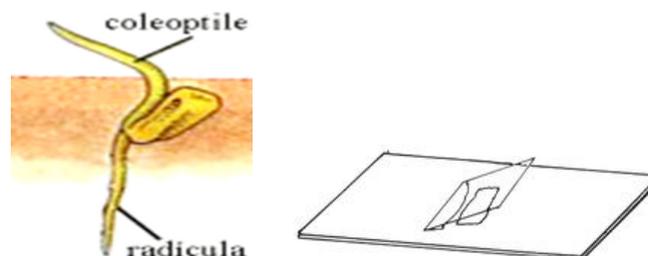
Procedimiento experimental

1. Mediante un bisturí y unas pinzas de disección, aislar una parte de la epidermis correspondiente a la zona cóncava de la tercera o cuarta cubierta de la cebolla y colocarla extendida en un portaobjetos. A continuación se añaden dos gotas de azul de metileno y se observa al microscopio óptico con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

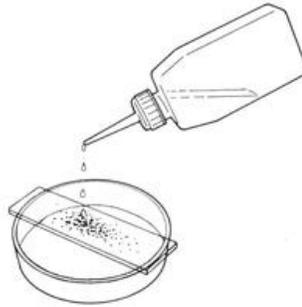


2. Posteriormente a la radícula de los embriones se les hace un corte transversal, lo más delgado posible. Depositar los cortes en el portaobjeto (sección a) y teñir con azul de metileno (sección b) y a continuación observar al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

a)



b)



Resultados

1. Capturar las imágenes del microscopio y/o esquematizar la pared celular tanto de la epidermis de cebolla como de los tejidos meristemáticos.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Mencionar la relación que existe entre la pared celular observada y la célula.
- Mencionar la importancia de la pared celular en los tejidos meristemáticos.

Conclusión generada por el estudiante

Questionario previo

1. Mencionar las principales funciones de la pared celular.
2. Indicar de qué está compuesta la pared celular.
3. ¿Qué otros organismos tienen pared celular? Mencionar sus características particulares.
4. ¿De dónde proviene la pared celular de la radícula?

Bibliografía

-  Azcon-Bieto J. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª ed. Mcgraw-Hill / Interamericana de España, S.A. España.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular: Conceptos y experimentos. McGraw Hill. México.
-  Escaso F, Martínez JL, Planello R. 2011. Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal. Prentice-Hall. México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Darnell JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. México.

Práctica 5

Respiración mitocondrial

Introducción

La energía en forma de ATP es utilizada por la mayoría de los seres vivos para realizar las funciones metabólicas. Esta energía la obtienen a partir del catabolismo de los carbohidratos en donde intervienen múltiples reacciones de óxido-reducción que están enfocadas a oxidar a los carbonos de la glucosa y convertirlos en CO_2 , como se observa en la siguiente reacción:



La oxidación de la glucosa se divide en tres grupos de reacciones principales denominadas: glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa.

La glucólisis es un proceso que se lleva a cabo en el citosol y es cuando a partir de una molécula de glucosa (6C) se producen dos moléculas de piruvato (3C). Este piruvato es transportado a la matriz mitocondrial en forma de acetil coenzima A para ingresar al ciclo de Krebs en donde hay liberación de dos moléculas de CO_2 por cada piruvato y se obtiene poder reductor en forma de $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 , que son sustratos que se requieren para la fosforilación oxidativa, que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial.

La fosforilación oxidativa es un proceso que se realiza en dos etapas básicamente. En la primera, la cadena respiratoria consta de cuatro complejos multiproteínicos embebidos en la membrana interna de la mitocondria los cuales contienen hierro o azufre. Estos complejos son los encargados por medio de reacciones de óxido-reducción de transferir electrones desde el $\text{NADH}+\text{H}^+$ o el FADH_2 hasta el oxígeno para formar agua. Por otro lado se lleva a cabo la translocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intramembranal. El flujo de protones genera un gradiente electroquímico que se denomina fuerza protón-motriz que es un tipo de energía acumulada por la diferencia de cargas.

La segunda etapa está confinada a la fosforilación oxidativa, la energía generada por el gradiente electroquímico de protones es utilizada por la enzima ATP-sintasa para la generación del ATP y su liberación a la matriz mitocondrial. Posteriormente hay sistemas de lanzaderas que permiten el transporte de esta energía al citosol para ser utilizado en el metabolismo celular y al mismo tiempo introducen más ADP hacia la matriz mitocondrial para sintetizar nuevo ATP (Figura 1).

Existen compuestos exógenos que intervienen directamente en la cadena oxidativa, los llamados inhibidores son moléculas que se unen en una subunidad específica o en un grupo prostético y compiten con los donadores o aceptores de electrones impidiendo la llegada de electrones al oxígeno. Mientras que los agentes desacoplantes son compuestos que abaten la fuerza protón-motriz, ya que introducen protones hacia la matriz mitocondrial y bloquean la síntesis de ATP.

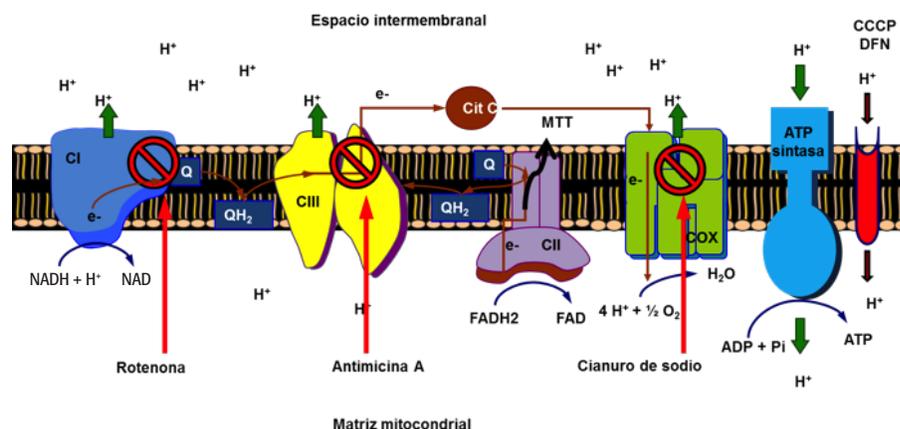


Figura.1. Representación esquemática de la cadena respiratoria y de los sitios donde actúan los inhibidores y desacoplantes.

Objetivo general

- Estudiar el proceso de la respiración mitocondrial en condiciones normales y en presencia de algunos agentes que la alteran.

Objetivos particulares

- Evaluar la importancia de la glucosa sobre la respiración mitocondrial de la levadura.
- Observar el efecto de los inhibidores sobre la respiración mitocondrial de la levadura.
- Valorar el efecto causado por los desacoplantes sobre la respiración mitocondrial de la levadura.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por grupo (se usará un día antes de la práctica)

- 1 Paquete de levadura en polvo (5 g).
- 1 Matraz Erlenmeyer o 1 vaso de precipitados de 1 L.
- 1 Agitador magnético o mosca.
- 1 Parrilla de agitación.
- 1 Balanza granataria.

Material por grupo (se usará el día de la práctica)

- 1 Balanza de dos platos.
- 2 Vasos de precipitados.
- 1 Agitador de vidrio.
- 4 Micropipetas de 10-100 μL con puntas de plástico.
- 4 Micropipetas de 100-1000 μL con puntas de plástico.
- 1 Balanza granataria.

Material por equipo

- 1 Centrifuga clínica.
- 2 Vasos de precipitados de 50 mL.
- 2 Pipetas Pasteur con bulbo.
- 1 Probeta de 250 mL.
- 4 Tubos de 50 mL para centrifuga.
- 1 Gradilla.
- 13 Tubos de ensayo o tubos de polipropileno de 15 mL.
- 1 Espectrofotómetro.
- 3 Celdas para espectrofotómetro.
- 1 Vaso de precipitados de 600 mL.

- 1 Piceta con agua destilada.
- 1 Pipeta graduada de 1 mL.
- 1 Pipeta graduada de 5 mL.
- 1 Pipeta graduada de 10 mL.
- 1 Palangana con hielo.
- 1 Termómetro.
- 1 Agitador Vórtex.
- 1 Espátula.

Material proporcionado por el alumno

- 1 Rollo de papel higiénico.
- 1 Papel aluminio (indispensable).

Reactivos

- Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico (MES).
- Glucosa.
- Metanol.
- Cianuro de sodio (NaCN).
- Antimicina A.
- Rotenona.
- Bromuro de 1-[4,5-dimetiltetrazol-2-il]-3,5-difeniltetrazolio (MTT).
- m-clorofenilhidrazona carbonil cianuro (CCCP) o 2,4 dinitrofenol (DNF).
- Trietanolamina (TEA). para ajustar el pH del amortiguador (MES).
- Hidróxido de sodio (NaOH).

Soluciones

- TEA al 50%.
- NaOH 2N (50 mL).
- MES 0.1 M pH 6.0. Se ajusta con TEA o con NaOH.
- Glucosa 1M (20 mL).
- *NaCN 40 mM ó KCN 40 mM (1 mL).
- *Antimicina A 1 mM (1 mL).
- *MTT, 4 mg/ml (60 mL).
- *CCCP 1 mM ó DNF 1 mM (1 mL).
- *Rotenona 2 mM (1 mL).

*Nota: Se deben manejar bajo las medidas de seguridad adecuadas.

Procedimiento experimental

A. Ayuno de las levaduras (por grupo)

1. Este procedimiento se llevará a cabo **24 horas antes** de realizar la práctica.
2. En el matraz Erlenmeyer de 1L, agregar 750 mL de agua destilada y un agitador magnético.
3. Agregar 5 g de levadura al matraz con el agua destilada.
4. Poner un tapón con una gasa y dejarlo 24 horas a temperatura ambiente.

Nota: es muy importante verificar que la parrilla sólo esté agitando y no calentando.

B. Preparación de las levaduras (por equipo)

1. Agitar homogéneamente la solución del matraz y tomar 100 mL de la suspensión de levadura y centrifugarlos a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Decantar el sobrenadante y recuperar el botón o pelet de las levaduras.
3. Pesar 3.25 g del pelet de las levaduras obtenido de la Centrifugación.
4. Resuspender el pelet perfectamente en 3.25 mL de agua destilada.
5. Tomar 250 μ L del homogenado de levaduras (5 gotas) y colocarlo en cada uno de los 13 tubos de ensayo.

C. Ensayo de respiración mitocondrial en las levaduras (por equipo)

1. La preparación de los tubos con las levaduras será por duplicado (12 tubos) excepto el blanco según la siguiente tabla:

Se considera que una gota es aproximadamente 50 μ L de solución.

	Blanco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
		Levadura + Agua	Levadura + Glucosa	Levadura + Glucosa + NaCN	Levadura + Glucosa + Antimicina A	Levadura + Glucosa + Rotenona	Levadura + Glucosa + Desacoplante
Agua (mL)	4.45	3.95	3.77	3.65	3.65	3.65	3.65
MES 0.1 M pH 6.0 (mL)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glucosa 1 M (mL)			0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
NaCN 40 mM				1 GOTA			
Antimicina A 1 mM					1 GOTA		
Rotenona 2 mM						1 GOTA	
CCCP 1 mM o DNF 1mM							1 GOTA
MTT 4 mg/mL (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

2. Agitar todos los tubos usando un agitador (agitador Vórtex).
3. Incubar los tubos a 30 °C por 15 min en obscuridad (cubrir los tubos con papel aluminio).
4. Pasar los tubos al hielo durante 5 min y colocarlos en una gradilla.
5. Agitar en el Vórtex para resuspender las levaduras antes de cada lectura.
6. Transferir a una celda espectrofotométrica y leer los tubos empezando por el blanco y ajustar a cero, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (se sugiere prender el espectrofotómetro 15 min antes de empezar a leer).
7. Anotar las lecturas de la densidad óptica (D.O.) obtenida de los 12 tubos.

TUBO	D.O.	TUBO	D.O.
1		1'	
2		2'	
3		3'	
4		4'	
5		5'	
6		6'	

Resultados

Anotar los datos obtenidos en una tabla y elaborar la gráfica, indicando un título, variables y unidades que se emplean.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Analizar la densidad óptica obtenida con glucosa como sustrato de la cadena respiratoria y comparar con la lectura de las levaduras a las que no se les agregó sustrato.
- Analizar los datos obtenidos con los diferentes inhibidores que se utilizaron e indicar las diferencias con las levaduras a las que se les agregó solo glucosa.
- Analizar los datos obtenidos con el desacoplante que se utilizó e indicar la diferencia con las levaduras a las que se les agregó solo glucosa.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario previo

1. Explicar, ¿qué es un sustrato de la cadena respiratoria? Y mencionar algunos ejemplos de éstos.
2. Investigar, ¿cuál es el efecto de la rotenona y la antimicina A sobre la cadena respiratoria? E indique a qué nivel actúa cada una.
3. Investigar, ¿cuál es el efecto del CCCP y el DNF sobre la cadena respiratoria? Indicar a qué nivel actúan.
4. ¿Cuál es la diferencia entre el efecto causado por un agente desacoplante y el de un inhibidor?

Bibliografía

-  Königsberg M. 1992. Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial. Libros de Texto y Manuales de Prácticas. UAM. México.
-  Königsberg M. 1997. Manual de Prácticas de Temas Selectos de Biofísica. Libros de Texto y Manuales de Prácticas. UAM. México.
-  Königsberg M. 2009. Manual de Bioquímica II. Libros de Texto y Manuales de Prácticas. UAM. México.
-  Kulawiak B, Gebert JHM, Guiard B, Wiedemann N, Gebert N. 2013. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta.* 1827 (5):612–626.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Ping- Lu S y Ju-Li S. 2010. Regulation of yeast Sirtuins by NAD Metabolism and Calorie Restriction. *Biochim Biophys Acta.* 1804 (8): 1567-1575.
-  Sánchez NS y Königsberg M. 2006. Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with MTT assay. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 34:209-212.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Wallström SV, Florez-Sarasa I, Araújo WL, Escobar MA, Geisler DA, Aidemark M, Lager I, Fernie AR, Ribas-Carbó M, Rasmusson AGA. 2014. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport. *Plant Cell Physiol.* 55 (5): 881-896.

Práctica 6

Extracción de los pigmentos en tejido vegetal y su separación cromatográfica

Introducción

La fotosíntesis es el proceso más importante en nuestro planeta ya que a partir de la energía solar se proveen de hidratos de carbono para la producción de energía en las plantas y animales, constituye el principal medio de fijación de carbono y es también la principal fuente de oxígeno en la atmósfera terrestre.

En la fotosíntesis es necesario que se lleve a cabo la captación de la luz solar y las moléculas que se encargan de atrapar esta energía son los pigmentos de absorción de luz. Las partes de estos pigmentos que absorben luz se denominan cromóforos que absorben eficientemente una longitud de onda específica de la luz visible. En la figura 1 se muestra algunos de los cromóforos más importantes.

En conjunto los cromóforos cubren todo el espectro de luz visible; los fotones de luz que llegan pueden absorberse por uno u otro de estos cromóforos. Los pigmentos más abundantes en las plantas superiores son la clorofila a y la clorofila b. El metal unido a las clorofilas es el Mg^{2+} .

En el caso de los vegetales, las clorofilas se encuentran en los cloroplastos formando parte de los fotosistemas I y II. Los carotenos y las xantofilas, son pigmentos complementarios que contribuyen con la absorción de luz de diferente longitud de onda a la de las clorofilas.

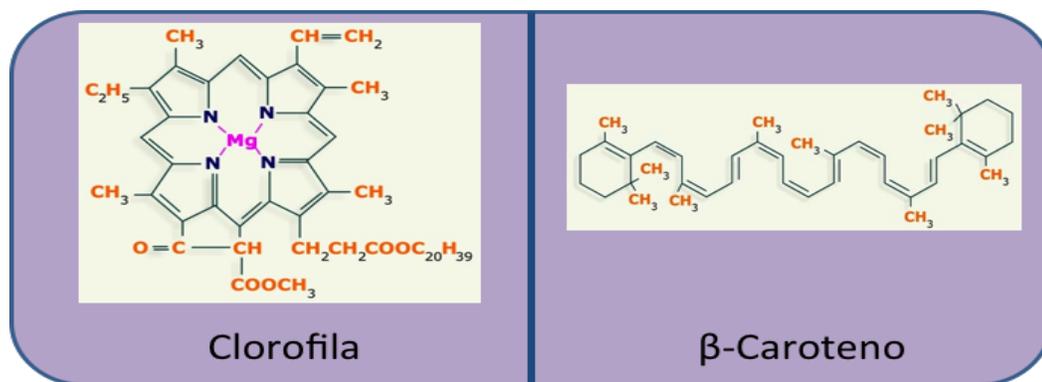


Figura 1. Representación esquemática de clorofila y β -caroteno.

Objetivo general

- Obtener los diferentes pigmentos presentes en los vegetales verdes.

Objetivos particulares

- Extraer los pigmentos de diferentes vegetales (hojas verdes como espinaca, perejil).
- Separar los cromóforos obtenidos de las hojas verdes por cromatografía en papel.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por grupo

1 Balanza de dos platos.

2 Vasos de precipitados de 50 mL.

1 Balanza granataria.

Material por equipo

1 Mortero con pistilo.

1 Embudo de vidrio.

1 Embudo de separación.

1 Soporte universal con anillo.

3 Vasos de precipitados de 100 mL.

2 Vasos de precipitados de 50 mL.

2 Pipetas graduadas de 5 mL.

2 Pipetas graduadas de 10 mL.

2 Pipetas Pasteur con bulbo.

1 Parrilla eléctrica.

1 Palangana con hielo.

1 Piceta con agua destilada.

Capilares adelgazados.

Papel filtro Whatman #1 para cromatografía.

Material proporcionado por el alumno

20 g de tejido vegetal limpio y seco (hojas verdes de espinaca, perejil, cilantro). Se sugiere que cada equipo trabaje con una muestra diferente.

4 Gasas de algodón.

1 Frasco con tapa (por equipo).

1 Par de guantes desechables (por equipo).

Reactivos

- Etanol.
- Éter dietílico.
- Éter de petróleo.
- Hexano.
- Sulfato de sodio.
- Metanol.

Soluciones

- Disolución de éter dietílico-metanol-hexano (45:15:5) (200 mL).
- Etanol al 70%.

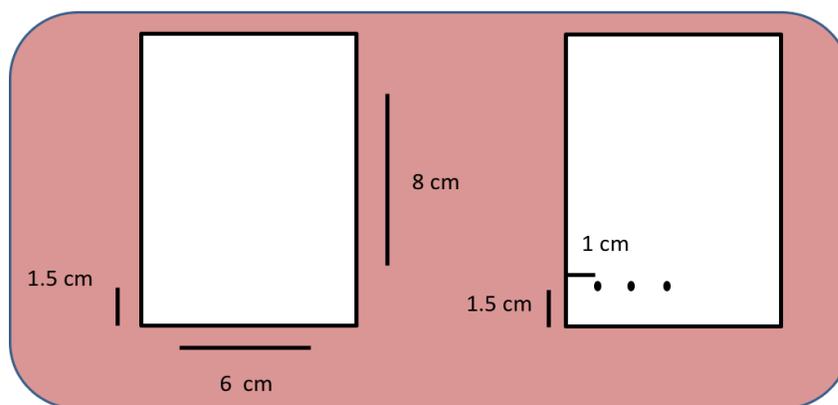
Procedimiento experimental

A. Extracción de los pigmentos

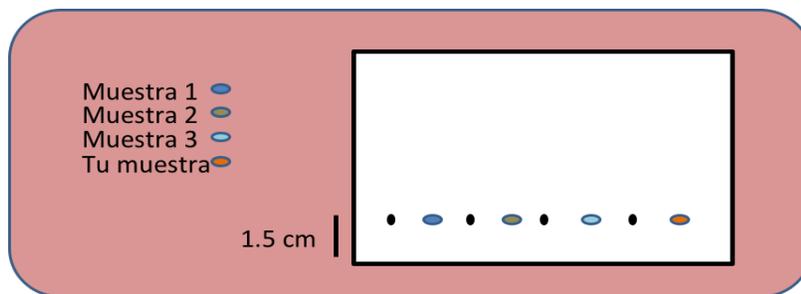
1. Colocar el mortero en un baño de hielo, la extracción de los pigmentos se lleva a cabo en frío.
2. Pesar 10 g del tejido vegetal sin los pecioloos, ni las venas grandes.
3. Trocear las hojas y macerar en 10 mL de etanol hasta que se forme una masa espesa.
4. Adicionar 5 mL de etanol y 10 mL de éter de petróleo.
5. Filtrar el macerado a través de las 2 gasas colocadas en el embudo de vidrio, recibiendo el filtrado en un embudo de separación.
6. Adicionar al embudo de separación 15 mL de disolución éter dietílico-metanol-hexano y 25 mL de agua destilada, lenta y suavemente resbalando por las paredes del embudo.
7. Agitar suavemente y dejar que se separen las dos fases. Desechar la fase acuosa y coleccionar la fase orgánica que se encuentra en la parte superior, en un vaso de precipitados de 50 mL.
8. Adicionar unos cristales de sulfato de sodio para eliminar los restos de agua.
9. Calentar levemente sobre una parrilla eléctrica para concentrar el extracto a un volumen de 2 mL.

B. Separación de los pigmentos obtenidos por cromatografía en papel

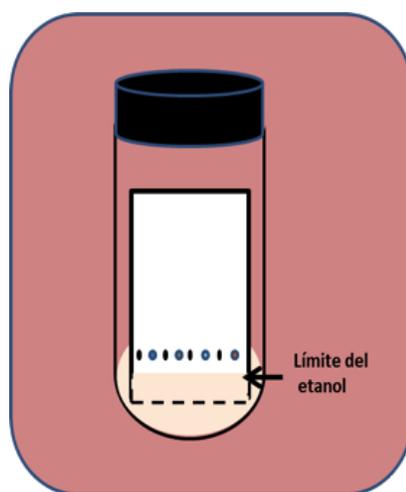
1. Colocar 20 mL de etanol al 70% en un frasco con tapa.
2. Ponerse guantes y cortar un fragmento de 6 x 8 cm de una hoja de papel Whatman # 1, el cual se debe colocar en una cartulina nueva. Marcar el sentido en que correrá la muestra, que se indica en la caja del papel Whatman.
3. Trazar con lápiz una línea tenue a 1.5 cm, con un punto marcar divisiones cada 1 cm. Se debe tener en cuenta, el sentido en que correrá la muestra.



4. Aplicar la muestra obtenida por usted, con un capilar que tenga la punta adelgazada. Poner una microgota entre los puntos marcados sobre el papel Whatman, dejar secar y repetir 5 veces la aplicación en el mismo punto, dejando secar en cada ocasión. Realizar el mismo procedimiento para otras dos o tres muestras obtenidas por otros equipos.



- Colocar el papel Whatman de forma vertical dentro del frasco con los 20 mL de etanol al 70%, sin que las muestras toquen este eluyente y tapar el frasco.



- Dejar correr la cromatografía durante 1.5 h. Sacar el papel del frasco y dejar secar por 10 min.
- Marcar con un lápiz los límites de las manchas y tomar la distancia desde el punto de aplicación. A partir de estos datos y la distancia a la que llegó el eluyente determinar el R_f de cada una de las muestras que se aplicaron al papel, empleando la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por cada muestra (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente (cm)}}$$

Resultados

- Capturar la imagen y/o realizar un diagrama similar a lo que se observa en el cromatograma.
- Determinar el R_f de cada uno de los pigmentos obtenidos y hacer una tabla comparativa de los R_f de cada una de las muestras obtenidas en la cromatografía.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Explicar el patrón de separación de los componentes de la mezcla de cada una de las muestras analizadas.
- ¿Se encontró diferencia en el corrimiento de los pigmentos obtenidos en los vegetales? ¿A qué se debe?
- ¿Cuántos pigmentos se obtuvieron en cada extracto y cuál es su afinidad con el eluyente?
- Comparar la cromatografía de los pigmentos con lo que se tiene reportado en la literatura.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario previo

1. ¿Qué es la fotosíntesis?
2. ¿Qué es un pigmento fotosintético, cuántos tipos hay, y a qué longitud de onda presentan un máximo de absorción de la luz solar?
3. ¿Qué es la clorofila y cuál es su participación en el proceso de la fotosíntesis?
4. ¿Cuál es el fundamento de la cromatografía en papel?
5. ¿Cuántos tipos de cromatografía podrían aplicarse en la separación de los pigmentos fotosintéticos y por qué?

Bibliografía

-  Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni GP. 2009. The world of the cell. Seventh Ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Salisbury F. y Ross .W. 1994. Fisiología de las plantas. Grupo Iberoamérica. México.
-  Steucek, GL., Hill RJ y Class/Summer. 1985. Photosynthesis I: An Assay Utilizing Leaf Disks. The American Biology Teacher, 47(2):96-99.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.

Práctica 7

Fotosíntesis: demostración de la tasa de fotosíntesis, empleando discos de hojas

Introducción

La fotosíntesis es un proceso por el cual la energía luminosa es convertida en energía química por los organismos autótrofos. En su fase luminosa, este proceso utiliza la luz para generar ATP y reducir NADP^+ a NADPH, que son empleados en la fase oscura (ciclo de Calvin) para fijar CO_2 y producir glucosa. En las plantas, ambas fases ocurren en el cloroplasto, dentro de las células del mesófilo de las hojas verdes (figura 1).

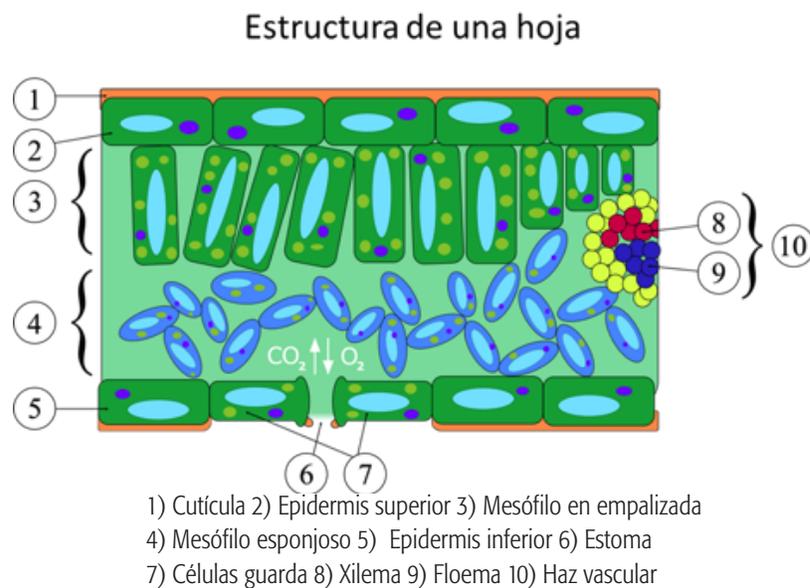
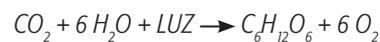


Figura 1. Corte transversal de una hoja, mostrando los diferentes tejidos que la componen.

La fotosíntesis puede ser resumida en la siguiente reacción:



La velocidad a la que ocurre la fotosíntesis depende directamente de la cantidad (brillantez) y calidad (longitud de onda) de la luz empleada, así como de otros parámetros.

Existen diferentes metodologías complejas para estudiar la fotosíntesis, sin embargo, se puede estudiar la tasa de fotosíntesis por una simple estimación de la tasa de producción de oxígeno en un disco de tejido de hoja. Los discos de hoja flotan normalmente, pero cuando son infiltrados con una solución de bicarbonato de sodio, la densidad relativa del disco aumenta, y éste se hunde. Al exponerlos a la luz, la fotosíntesis se lleva a cabo en el mesófilo de la hoja, y el oxígeno producido desplaza al líquido infiltrado de los espacios intercelulares y la densidad en el disco disminuye, haciéndolo flotar (figura 2). El tiempo requerido para que el disco flote es inversamente proporcional a la tasa de fotosíntesis. En el procedimiento, la fuente de dióxido de carbono es una solución de bicarbonato de sodio.

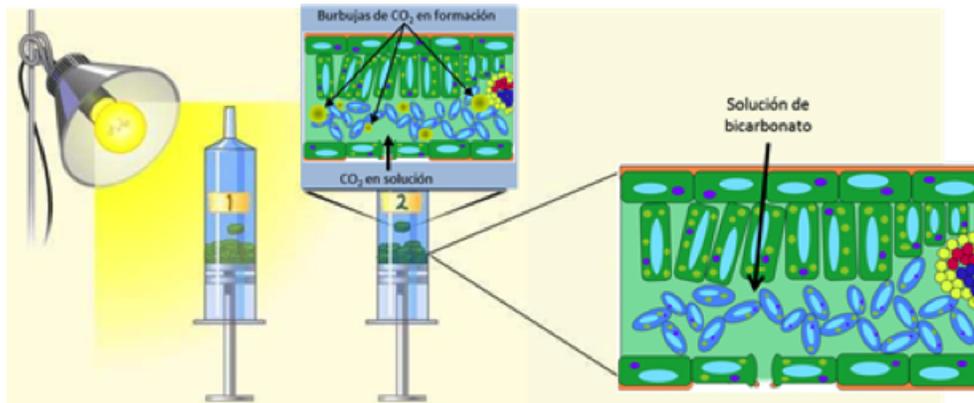


Figura 2. Al exponer los discos de hoja a la luz, se produce O₂ que llena los espacios dentro del tejido de la hoja y hace que esta flote.

Objetivo general

- Estudiar el proceso de fotosíntesis en una planta verde.

Objetivos particulares

- Determinar la tasa de fotosíntesis en una planta verde.
- Demostrar como la tasa de fotosíntesis puede ser modificada por luz de diferentes longitudes de onda.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Agitador de vidrio.
- 5 Jeringas de plástico de 20 mL sin aguja.
- 5 Tapones de goma.
- 2 Vasos de precipitados de 250 mL.

Material proporcionado por el alumno

- 1 Lámpara de mesa con foco.
- 1 Perforadora de papel o un popote.
- Hojas frescas, de preferencia de una planta de hoja ancha.
- Toallas de papel.
- 1 Cronómetro o reloj con segundero.
- Papel celofán de colores rojo, verde, amarillo y azul.
- 1 Papel aluminio.
- 1 Cinta adhesiva (Masking tape).

Reactivos

- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- Jabón líquido.

Soluciones (por equipo)

- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 300 mL al 0.1 M o 0.2%.
- Solución de jabón líquido diluido. Una gota en medio litro de agua. (5 mL).

Procedimiento experimental

1. Cortar varios discos de la parte verde de una hoja con una perforadora de papel, o con un popote (figura 3A). Evite la parte de las venas y manéjelos con cuidado ya que se trata de células vivas y se pueden dañar fácilmente. La superficie de la hoja debe ser suave y no muy gruesa, y no debe tener vellosidades. Se obtienen buenos resultados con hojas de espinaca o de hiedra.
2. Colocar los discos (entre 5 y 10) dentro de una jeringa y coloque con cuidado el émbolo para no dañar los discos (figura 3B). El número de discos dependerá del volumen de la jeringa. Se recomienda colocar 5 discos para la jeringa de 20 mL o 10 discos para la de 50 mL.

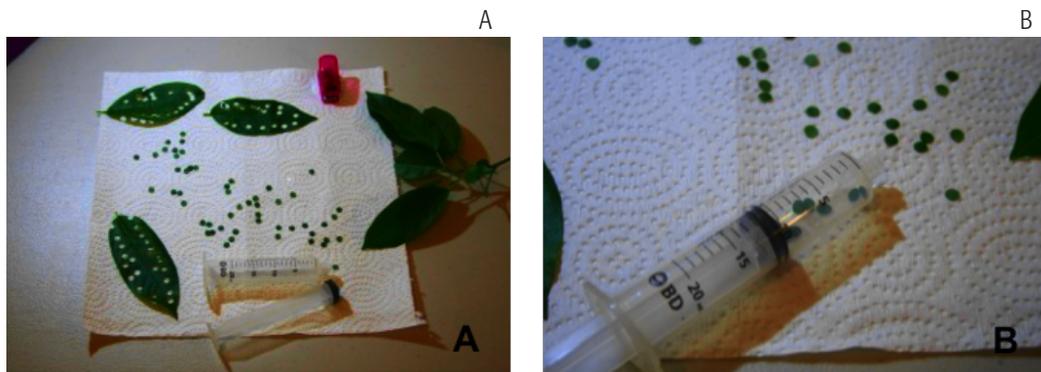


Figura 3. Cortar pequeños discos de una hoja verde, y posteriormente se introducen en una jeringa conteniendo una solución de bicarbonato de sodio.

3. Llenar la jeringa con una solución de NaHCO_3 hasta aproximadamente 3 cuartos de su capacidad. Agregue una gota de jabón líquido diluido a la solución de bicarbonato para hacerla más hidrofílica y permitir que penetre más fácilmente a la hoja.
4. Retirar el aire dentro de la jeringa presionando el émbolo hasta que el líquido comience a salir de la punta de la jeringa (Figura 4A).
5. Sellar la punta de la jeringa presionándola fuertemente sobre un tapón de goma o con el dedo. Jale el émbolo de la jeringa mientras la agita, y elimine cualquier nuevo residuo de aire. El gas se expandirá y saldrá de los discos de hoja (Figura 4B).

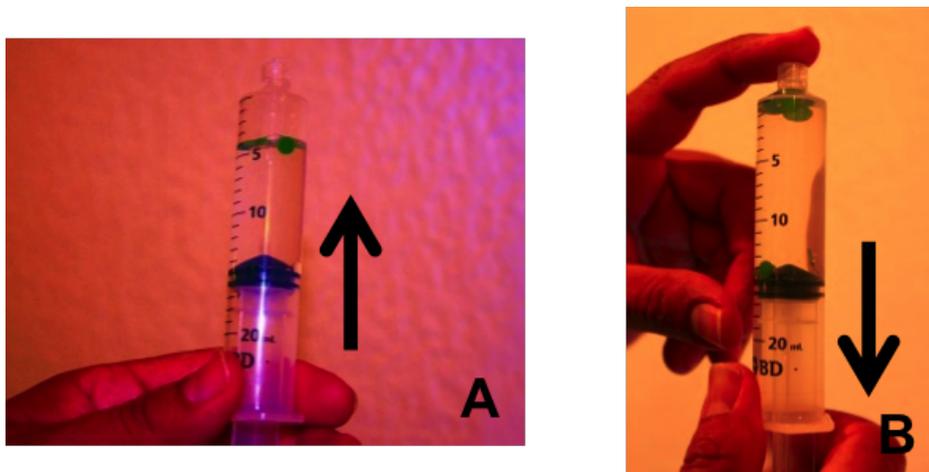


Figura 4. Procedimiento para infiltrar los discos de hoja con la solución de bicarbonato.

6. Repetir el paso 5 hasta que no salgan más burbujas y todos los discos se hundan hasta el fondo del líquido.
7. Retirar el dedo o el tapón de la punta de la jeringa, y colóquela en posición vertical, frente a la luz directa de una lámpara de mesa o frente a la luz del sol. Registre el número de discos que flotan al cabo de cada minuto. Agite suavemente la jeringa para separar los discos que se hayan adherido entre sí.
8. Continuar con el registro de los discos que flotan al cabo de cada minuto, hasta que todos los discos se encuentren flotando.
9. Indicar los resultados en una gráfica de número de discos flotando contra el tiempo.
10. Repetir el experimento empleando varias jeringas, cubiertas cada una de ellas con papel celofán de color rojo, verde, amarillo o azul, durante la exposición a la luz. Realice un experimento con la jeringa cubierta con papel aluminio como control negativo de la fotosíntesis. En este último caso, revise rápidamente la jeringa al cabo de cada minuto, de modo que la exposición a la luz sea mínima.

Resultados

1. Registre los resultados en la siguiente tabla como se indica:

Tabla de datos

Número de discos flotantes					
Tiempo (minutos)	Luz blanca	Luz roja	Luz verde	Luz amarilla	Oscuridad
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Nota: Continuar la tabla hasta completar 15 minutos de observación, o hasta que todos los discos se encuentren flotando.

2. Elabore una gráfica con los resultados obtenidos, colocando el tiempo (eje X) y el número de discos flotando (eje Y). Utilice una línea de color diferente para cada experimento (Figura 5).

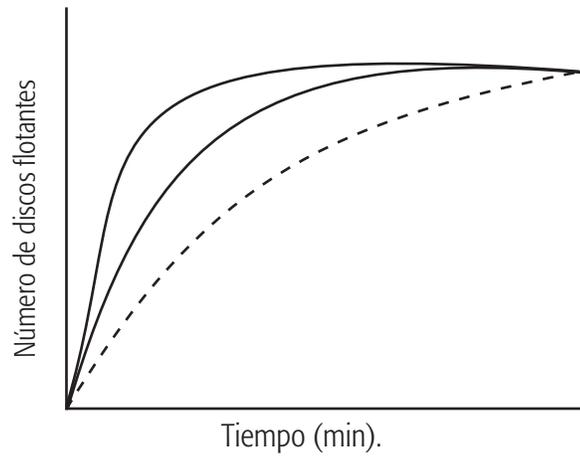


Figura 5. Gráfica con los resultados obtenidos.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Compare los datos obtenidos para cada una de las condiciones experimentales, indicando qué era lo esperado de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Conclusión generada por el alumno

Questionario previo

1. ¿Cuál es el rango de longitud de onda que absorben cada uno de los pigmentos que participan en la fotosíntesis?
2. ¿Cómo se produce el oxígeno durante la fase luminosa de la fotosíntesis?
3. ¿Por qué se emplea una solución de bicarbonato de sodio como fuente de CO_2 para el experimento?
4. ¿Qué diferencias se esperan entre los experimentos realizados en diferentes condiciones de iluminación?
5. ¿Por qué flotan los discos de hoja después de ser expuestos a la luz?

Bibliografía

-  Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni GP. 2009. The world of the cell. Seventh Ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Salisbury F. y Ross .W. 1994. Fisiología de las plantas. Grupo Iberoamérica. México.
-  Steucek, GL., Hill RJ y Class/Summer. 1985. Photosynthesis I: An Assay Utilizing Leaf Disks. The American Biology Teacher, 47(2):96-99.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Wickliff, JL y Chasson, RM. 1964. Measurement of photosynthesis in plant tissues using bicarbonate solutions. Bioscience, 14: 32-33.

Anexo

Otras especies de plantas recomendadas para esta práctica.



Dieffenbachia, conocida en México como "Amoena". Pertenece a un género de plantas tropicales de la familia *Aráceae* con características manchas claras en sus hojas. Son utilizadas frecuentemente como planta de interior debido a su tolerancia a la sombra.



Ligustrum vulgare, es una especie de planta perteneciente a la familia *Oleaceae*. Conocido en México como trueno, por el parecido de sus ramas torcidas con el relámpago. Es un arbusto de 2 a 3 m de altura, con hojas parecidas a las del olivo, pero de color más verde, son opuestas y lanceoladas. Las flores son blancas y olorosas. El fruto es una baya negra, amarga y tóxica.

Práctica 8

Obtención y determinación cuantitativa del ácido desoxirribonucleico

Introducción

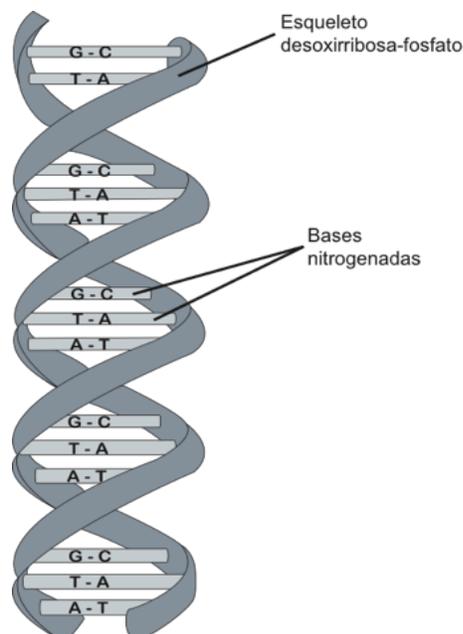
El ácido desoxirribonucleico (DNA), es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y es responsable de su transmisión hereditaria. En los organismos eucariotas, la mayor parte de su DNA, se encuentra almacenado dentro del núcleo celular y una mínima parte en elementos celulares llamados mitocondrias y cloroplastos.

La molécula de DNA está constituida por dos largas cadenas de polinucleótidos unidas entre sí por puentes de hidrógeno formando una doble hélice. Estos nucleótidos están formados por la unión de un monosacárido (desoxirribosa), un ácido fosfórico y una base nitrogenada de tipo púrico (adenina y guanina) o pirimidínico (citosina o timina).

En la doble hélice las bases nitrogenadas se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno; dos entre adenina-timina (A-T) y tres entre citosina-guanina (C-G) y viceversa, de esta forma las cadenas son complementarias. El orden en el que aparecen las cuatro bases a lo largo de una cadena en el DNA es crítico para la célula, ya que este orden es el que constituye las instrucciones del programa genético de los organismos.

En el interior del núcleo de las células eucariotas, el DNA está asociado a proteínas especiales llamadas histonas, formando la cromatina. Durante la división celular, la cromatina se condensa formando los cromosomas. Para extraerlo es necesario homogeneizar el tejido y romper las células para separar el núcleo, romper también la envoltura nuclear para liberar su contenido, luego separar el DNA de las proteínas que lo protegen y, por último, precipitarlo para extraerlo de la solución. Una vez realizado esto, el DNA aparecerá como un agregado de fibras blanquecinas.

La desoxirribosa en soluciones fuertemente ácidas se deshidrata dando aldehído 5-hidroxilevulínico. Este aldehído se condensa con la difenilamina dando un compuesto de color azul que absorbe a 595 nm de longitud de onda. Esta reacción puede ser usada para cuantificar la cantidad de DNA presente en la muestra.



Representación de la doble hélice del DNA

Objetivo general

Extraer el ácido desoxirribonucleico a partir de un tejido animal y determinar su identificación cuantitativamente.

Objetivos particulares

- Extraer el DNA a partir de un tejido animal.
- Determinar la cantidad de DNA extraído.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

- 2 Morteros con pistilo.
- 1 Bisturí.
- 1 Embudo.
- 1 Probeta de 100 mL.
- 2 Vasos de precipitados de 250 mL.
- 1 Pipeta Pasteur.
- 1 Centrífuga.
- 2 Tubos de centrífuga de 50 mL.
- 1 Piceta con agua destilada.
- 7 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm.
- 1 Pipeta graduada de 5 mL.
- 1 Pipeta graduada de 10 mL.
- 1 Pipeta graduada de 2 mL.
- 1 Gradilla.
- 1 Palangana con hielo.
- 1 Balanza de dos platos.
- 1 Espectrofotómetro.
- 2 Celdas para espectrofotómetro.

Material proporcionado por los alumnos

- 10 g Hígado de pollo fresco.
- 2 Bolsas de gasa estéril.
- 1 Papel aluminio.

Reactivos

- Alcohol etílico.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Difenilamina.
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Ácido desoxirribonucleico (DNA).
- Ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$).
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Soluciones

- Alcohol etílico 95% frío. (500 mL).
- NaCl 2 M. (500 mL).
- SDS al 5%. (10 mL).
- Reactivo de difenilamina (0.8 g en 80 mL de ácido acético y adicionar 2.0 mL de ácido sulfúrico concentrado, preparar en fresco, 80 mL).
- Solución patrón de DNA 0.2 mg/mL (50 mL).

Procedimiento experimental

A. Extracción de DNA

1. Enfriar el mortero en un baño de hielo.
2. Pesar 10 g de hígado de pollo fresco en un papel aluminio y fragmentarlo con el bisturí en el mortero frío.
3. Macerar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea manteniendo el mortero en hielo.
4. Adicionar 50 mL de agua destilada y remover suavemente.
5. Filtrar la suspensión a través de dos capas de gasa con ayuda del embudo de vidrio, recuperando el filtrado en un vaso de precipitados de 250 mL que debe estar en el baño de hielo.
6. Adicionar 50 mL de la solución de NaCl 2M y mezclar suavemente.
7. Agregar 1 mL de SDS y mezclar suavemente, evitando que se forme espuma.
8. Dejar incubar en el hielo durante 10 min.
9. Añadir lentamente, dejando resbalar por las paredes del vaso de precipitados 50 mL de etanol frío. No mezclar.
10. Dejar incubar en hielo durante 10 min. Es muy importante evitar que se mezclen las soluciones, pues será en la interfase donde precipitará el DNA.
11. Tomar el DNA de la interfase con la ayuda de una pipeta Pasteur, con cuidado de no tomar la fase inferior, y transferirlo a un tubo de centrifuga.
12. Centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5 min y desechar el sobrenadante.
13. Disolver el botón en 5 mL de agua destilada y mantener en hielo.
14. Tomar una alícuota de DNA para realizar la cuantificación.

B. Cuantificación de DNA

1. Disponer de una serie de tubos de ensayo para realizar la curva patrón de DNA y agregar los reactivos como se indica en la siguiente tabla:

Reactivos	Tubo No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de DNA (mL)	–	0.2	0.4	0.8	1.0	–	–
Agua (mL)	1.0	0.8	0.6	0.2	–	–	–
Muestra de DNA (mL)	–	–	–	–	–	1.0	1.0

2. Adicionar 2.0 mL del reactivo de difenilamina (con mucho cuidado) a cada tubo.
3. Incubar todos los tubos en baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
4. Dejar enfriar y medir la absorbancia a 595 nm de longitud de onda, usar como blanco el tubo No. 1.

Resultados

1. Graficar la curva patrón de DNA, obtener los valores de ecuación de la recta y calcular la cantidad de DNA presente en la muestra.
2. Indicar los niveles de DNA que contiene la muestra y comparar con los valores obtenidos por otros grupos de trabajo.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Con base a las observaciones, explicar a qué se debe el color obtenido en la muestra de DNA.
- Indicar qué tipo de molécula es la difenilamina y por qué se puede utilizar para cuantificar al DNA.
- Mencionar si el método de extracción es el adecuado y si existen otros métodos.

Conclusión generada por el estudiante

Cuestionario previo

1. ¿Cuál es la función y la importancia del DNA en los organismos?
2. ¿Cuál es la composición y la función de los cromosomas?
3. ¿Qué diferencia existe entre los nucleótidos de DNA y los de RNA?
4. ¿Por qué el DNA en solución se precipita en presencia de alcohol frío?
5. ¿Cuál es el efecto del cloruro de sodio y del SDS en la técnica?

Bibliografía

-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la Célula. 5ª ed. Omega. España.
-  Gerdel-Taylor C. 2005. Diphenylamine assay of DNA fragmentation for chemosensitivity testing. *Methods Mol Med*.111:79-82.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México. México.
-  Lewin B. 2008. Genes IX. Jones and BartlPicetaett Publishers. USA.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Darnell JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Rice PA y Correll CC. 2008. Protein-nucleic acid interactions: Structural biology. Royal Society of Chemistry. USA.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.

Práctica 9

Mitosis

Introducción

La mitosis (del griego *mitos*, filamento) es el proceso de división celular en el cual a partir de una célula se originan 2 células hijas con igual número y tipo de cromosomas. Este tipo de división celular es semejante en todas las células eucariotas, y es llevado a cabo por las células somáticas, aunque existen algunas diferencias entre células vegetales y animales. En las células vegetales, la mitosis se lleva a cabo sin la presencia de centriolos y ásteres, ya que carecen de ellos.

El proceso de división celular inicia al final del periodo G_2 de la interfase, y termina al iniciarse el periodo G_1 de una nueva interfase. Está conformado por las etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Cuando se originan las células hijas, ocurre la separación del citoplasma el cual se denomina: citocinesis. Éste puede ser simultáneo con la anafase y la telofase o puede producirse en una etapa posterior.

En la profase, cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas, resultado de la duplicación del DNA en el periodo S, o de síntesis del DNA en la interfase. Conforme progresa esta etapa, la cromatina se observa cada vez más condensada, para dar origen a cada una de 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 prometafase. Alrededor de los centriolos en cada polo celular, se forman los ásteres y comienza a observarse la presencia del huso mitótico.

Al inicio de la metafase (del griego *meta*, entre), los microtúbulos se alargan y se unen a los cromosomas, que están dispersos en el citoplasma. Posteriormente se orientan en el plano ecuatorial.

Durante la anafase (del griego *ana*, de nuevo) 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 (del griego *telo*, fin) se 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, se forman los nucléolos, por medio de los organizadores nucleolares que se encuentran en algunos cromosomas, se lleva a cabo la citocinesis y se originan las 2 células hijas (figura 1).

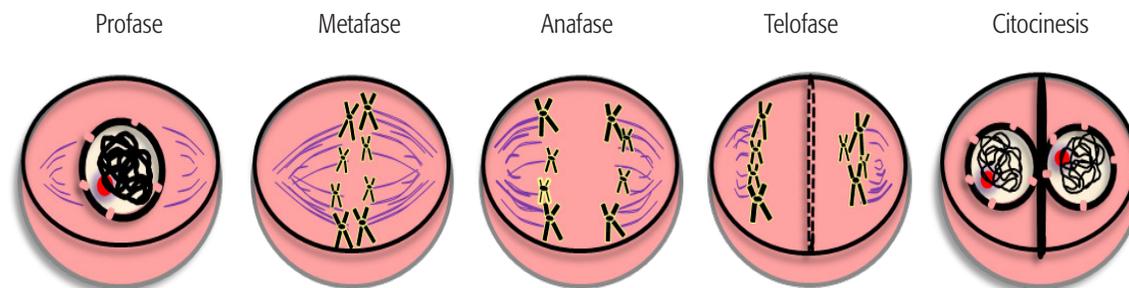


Figura 1. Etapas de la mitosis.

Objetivo general

- Estudiar el proceso de la mitosis en células vegetales.

Objetivos particulares

- Identificar a las células que se encuentren en mitosis y diferenciarlas de células en interfase.
- Examinar las células en mitosis e identificar en qué fase se encuentran.
- Determinar el índice mitótico en diferentes tipos de muestras con células en mitosis, en ausencia y presencia de un agente mitostático.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

Material y equipo

Material por equipo

- 1 Microscopio óptico.
- 1 Estuche de disección.
- 1 Caja de portaobjetos.
- 1 Caja de cubreobjetos.
- 2 Vidrios de reloj.

Material proporcionado por los alumnos

- Cebolla con raíces recién formadas.
- Semillas de haba, frijol, garbanzo, etc. recién germinadas.
- 1 Navaja para corte fino.

Reactivos

- Etanol.
- Ácido acético.
- Orceína.
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Colchicina.
- Aceite de inmersión.

Soluciones

- Solución fijadora: etanol con ácido acético 3:1. (100 mL).
- HCl al 1 N. (10 mL).
- Solución de acetorceína: calentar a ebullición 55 mL de ácido acético, agregar 2 g de orceína y dejar hervir 7-10 min. Dejar enfriar totalmente y agregar 55 mL de agua destilada. Filtrar y mezclar 90 mL de esta solución con 10 mL de HCl 1 N.
- Colchicina al 0.1% en agua destilada.

Procedimiento experimental

Una semana antes de la práctica.

Muestras de cebolla.

1. Observar la cebolla, en caso de que la coronilla tenga raíces muertas y/o esté de color grisáceo, cortar una delgada rebanada para desechar el tejido muerto.
2. Colocar la cebolla limpia en un frasco o vaso con agua, la coronilla debe estar en contacto con el agua.
3. Cambiar el agua todos los días.
4. Un día antes de la práctica mantener la cebolla en la obscuridad y exponerla a la luz en el momento de la práctica.



Muestras de semillas germinadas.

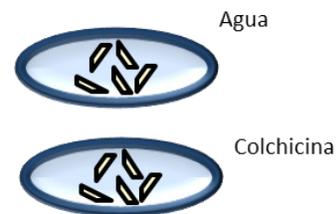
1. Lavar las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (20 gotas de cloro comercial en 100 ml de agua), durante 3-5 minutos y nuevamente enjuagarlas con agua limpia.
2. En un recipiente o frasco de vidrio colocar un poco de algodón para formar una cama y humedecer.
3. Colocar las semillas sobre la capa de algodón, distribuyéndolas homogéneamente.
4. Colocar el recipiente en un lugar donde se expongan a la luz del día y cuidar que siempre esté húmedo el algodón.



5. Al momento de llevar las raíces y semillas germinadas al laboratorio, se debe cuidar que las muestras siempre estén húmedas y no experimenten cambios drásticos de temperatura o se maltraten.

Al momento de la práctica.

1. De las raíces de cebolla y semillas germinadas, cortar la parte apical del tejido meristemático (aproximadamente rebanadas de menos de 1 mm), en algunas muestras se podrá observar una coloración amarillenta.
2. En los vidrios de reloj hacer dos lotes con las muestras de raíces de cebolla, en uno se colocarán en un mililitro de agua de la llave (testigo), y en el otro las raíces se sumergen en un mililitro de una solución de colchicina al 0.1%.
3. Se dejan reposar por una hora. Hacer lo mismo con las muestras de raíz de las semillas de haba o de las muestras que se dispongan. Etiquetar cada uno de los lotes.

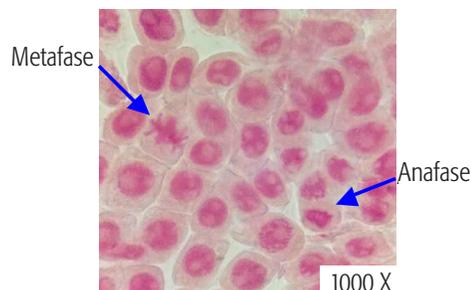


4. Posteriormente, quitar el líquido (agua o colchicina). Esto se puede hacer absorbiéndolo con papel.
5. Agregar unas gotas de la solución fijadora a las muestras hasta cubrir las. Dejar reposar 2-4 min.
6. Retirar el fijador, nuevamente con papel absorbente.
7. Colocar una muestra de raíz en un portaobjetos etiquetado previamente.
8. Agregar una gota de acetorceína, suficiente para cubrir la muestra. Dejar reposar 5 min.
9. Poner un cubreobjetos a la muestra, verificar que el colorante no se haya evaporado. Colocar el portaobjetos en una toalla de papel, cubriendo la cara superior del cubreobjetos con una parte de la toalla.
10. Con una goma de lápiz hacer presión sobre el cubreobjetos para disgregar el tejido. El excedente de colorante se absorberá por la toalla de papel.
11. Observar la laminilla al microscopio óptico con los objetivos de 10, 40 y 100 X. Al usar el objetivo de 100 X, no olvidar colocar una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos. Obtener fotos de las figuras mitóticas.
12. Realizar el conteo de células en varios campos observados, para obtener el índice mitótico. Determinar el índice mitótico, en cada una de las muestras de diferentes lotes.

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células en mitosis} \times 100}{\text{Número total de células contadas}}$$

Resultados

1. Hacer observaciones al microscopio óptico para encontrar células en división mitótica. Capturar imágenes e indicar características y aumento, como se muestra en el ejemplo a continuación.



Figuras mitóticas en una muestra de cebolla.

Muestras de raíz de cebolla	
<i>Lote 1: Muestras testigo</i>	<i>Lote 2: Muestras en colchicina</i>
(fotos)	(fotos)

Muestras de raíz de haba germinada	
<i>Lote 1: Muestras testigo</i>	<i>Lote 2: Muestras en colchicina</i>
(fotos)	(fotos)

Muestras de raíz de (otras muestras que se dispongan)	
<i>Lote 1: Muestras testigo</i>	<i>Lote 2: Muestras en colchicina</i>
(fotos)	(fotos)

Tipo de muestra	Determinación del índice mitótico:						
	No. de células contadas	No. de células en mitosis	I.M.	No. de células contadas	Lote 1: testigo	Lote 2: colchicina	I.M.

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Tipo de muestras.
- Efecto de la colchicina para obtener el índice mitótico y compararlo con respecto a los resultados de los testigos.
- Indicar cuál es la utilidad de tener muestras testigo.

Conclusión generada por el alumno

Questionario previo

1. Esquematizar y describir brevemente qué es la mitosis y sus fases.
2. ¿Qué es la colchicina y cuál es su función en esta práctica?
3. ¿Cuál es la función del fijador y cuál la del colorante empleado en esta práctica?
4. Mencionar 5 ejemplos de células que realizan mitosis e indicar el tiempo que tardan para realizarla.

Bibliografía

-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la célula. 5ª ed. Omega, España.
-  Becker W M, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni GP. 2009. The world of the cell. Seventh ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  De Robertis EMF y Hib J. 2011. Fundamentos de Biología Celular y Molecular. De Robertis. 4ª ed. El Ateneo. Argentina.
-  Howe B, Umrigar A, Tsien F. 2014. Chromosome Preparation From Cultured Cells. J. Vis. Exp. (83), e50203, doi:10.3791/50203.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México. México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Darnell JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Tiang CL, He Y, Pawlowski WP. 2012. Chromosome organization and dynamics during interphase, mitosis, and meiosis in plants. Plant Physiol. 158; 1:26-34.
-  Voet D. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Wijnker E, Schnittger A. 2013. Control of the meiotic cell division program in plants. Plant Reprod. 26; 3:143-58.

Práctica 10

Meiosis en célula vegetal

Introducción

La meiosis es el tipo de división celular, en la cual se originan 4 células hijas y cuyo material genético constituye un número haploide de cromosomas (n). Cada una de las células hijas producidas por meiosis contiene un complejo único de cromosomas, debido al entrecruzamiento y a la segregación al azar de ellos. De esta forma, la meiosis es una fuente de variabilidad en la descendencia.

Durante la meiosis, cada célula diploide se divide dos veces, y el DNA sólo se duplica una vez, antes de la primera división nuclear. Así, cada una de las cuatro células producidas al final, contiene la mitad del número de cromosomas presentes en el núcleo de la célula original.

La meiosis consiste en dos divisiones sucesivas, designadas convencionalmente meiosis I y meiosis II. Durante este proceso de división se redistribuyen los cromosomas y se producen células que tienen un número haploide de cromosomas (n). Durante la interfase que precede a la meiosis, los cromosomas se duplican. En la profase I de la meiosis, los cromosomas homólogos se aparean.

Cada par homólogo está formado por cuatro cromátidas. Cada homólogo consta de dos cromátidas hermanas idénticas, que se mantienen unidas por el centrómero. Mientras los homólogos están apareados, ocurre entre ellos el entrecruzamiento, dando como resultado el intercambio de material cromosómico, permanecen asociados en los puntos de entrecruzamiento -o quiasmas- hasta el final de la profase I. Luego, los cromosomas comienzan a separarse, las cromátidas hermanas de cada homólogo ya no son completamente idénticas.

Al finalizar la meiosis I, los cromosomas homólogos se separan. Se producen dos núcleos, cada uno con un número diploide de cromosomas. Cada cromosoma, a su vez, está formado por dos cromátidas. Los núcleos pueden pasar por un periodo de interfase, pero el material cromosómico no se duplica.

En la segunda etapa de la meiosis, la meiosis II, las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan, como si fuese una mitosis. Cuando los dos núcleos se dividen, se forman cuatro células haploides (figura 1).

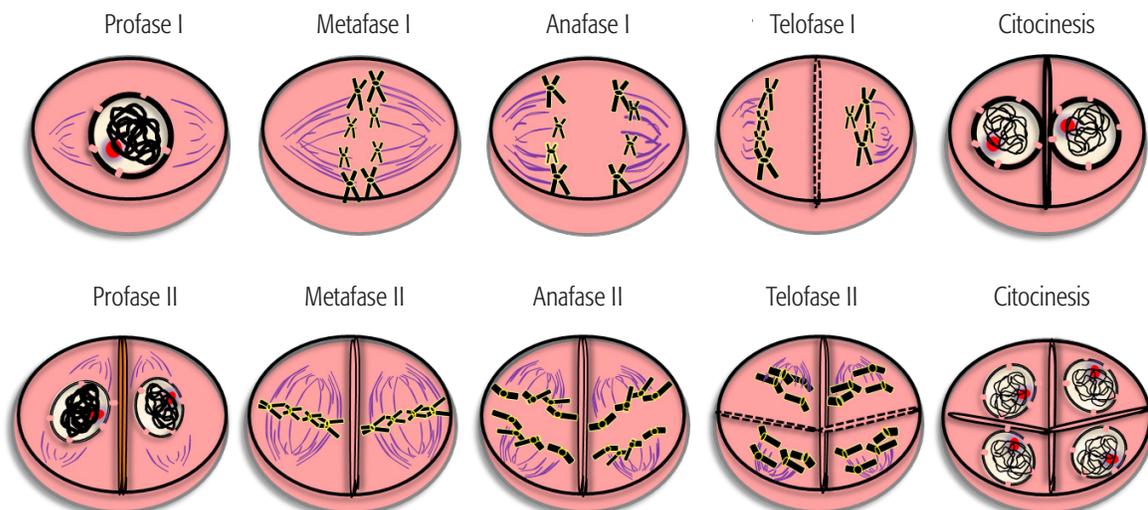


Figura 1. Etapas de la meiosis.

Objetivo general

- Identificar diferentes fases de la meiosis en células de tipo vegetal.

Objetivos particulares

- Realizar la disección de inflorescencias.
- Identificar los órganos sexuales masculinos.
- Obtener las células gaméticas masculinas en fase temprana de desarrollo.
- Fijar y teñir las células gaméticas.
- Observar e identificar por microscopía óptica células en alguna fase de la 1ª o 2ª división meiótica.

Hipótesis

Generada por el estudiante.

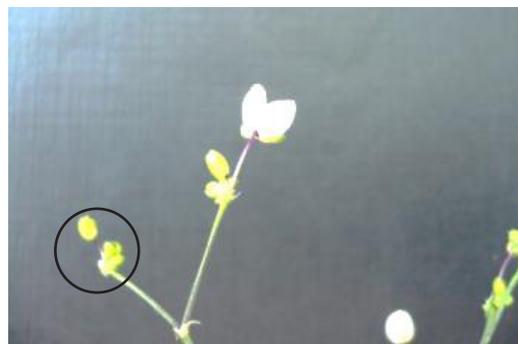
Material y equipo

Material por equipo

- 1 Microscopio estereoscópico.
- 1 Microscopio óptico.
- 1 Estuche de disección.
- 2 Jeringas de insulina (se ocuparan las agujas, para la disección).
- 1 Caja de portaobjetos.
- 1 Caja de cubreobjetos.

Material proporcionado por los alumnos

Botones florales en primeras etapas de desarrollo de *Gibasis geniculata* (apagafuego, hoja de cucaracha, mataliz) o botones florales en primeras etapas de desarrollo de otra planta que se disponga.



Reactivos

- Etanol.
- Ácido acético.
- Orceína.
- Ácido clorhídrico (HCl).

Soluciones

- Solución de etanol con ácido acético 3:1 (100 mL).
- HCl al 1 N (10mL).
- Solución de acetorceína: Calentar a ebullición 55 mL de ácido acético, agregar 2 g de orceína y dejar hervir 7-10 min. Dejar enfriar totalmente y agregar 55 mL de agua destilada. Filtrar y mezclar 90 mL de esta solución con 10 mL de HCl 1 N.

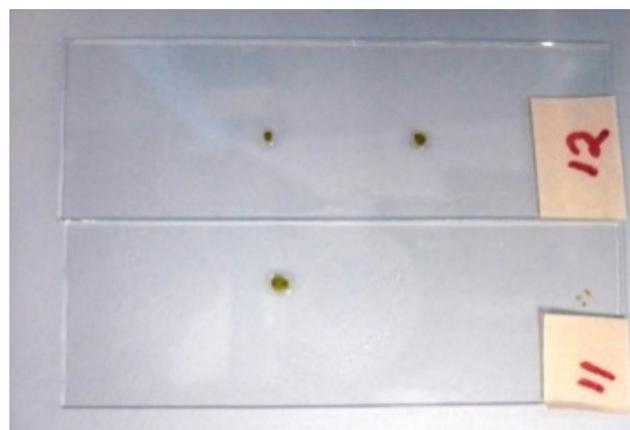
Procedimiento experimental

A. Obtención de las células gaméticas

1. De la planta elegida, obtener los botones florales en las primeras etapas de desarrollo y colocarlas en un portaobjeto. Ejemplo de la muestra de interés.

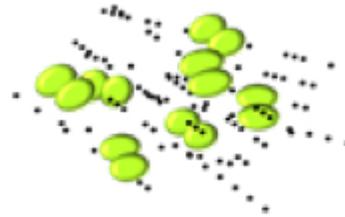


2. Agregar una gota del fijador y hacer la disección bajo el microscopio estereoscópico.



3. Con la punta de las agujas de las jeringas de insulina quitar parte de los sépalos, que se ven en color verde, y dejar al descubierto los estambres con las anteras.

- Cortar las anteras y separarlas del resto de tejido vegetal. Si la muestra se seca se puede agregar otra gota del fijador.



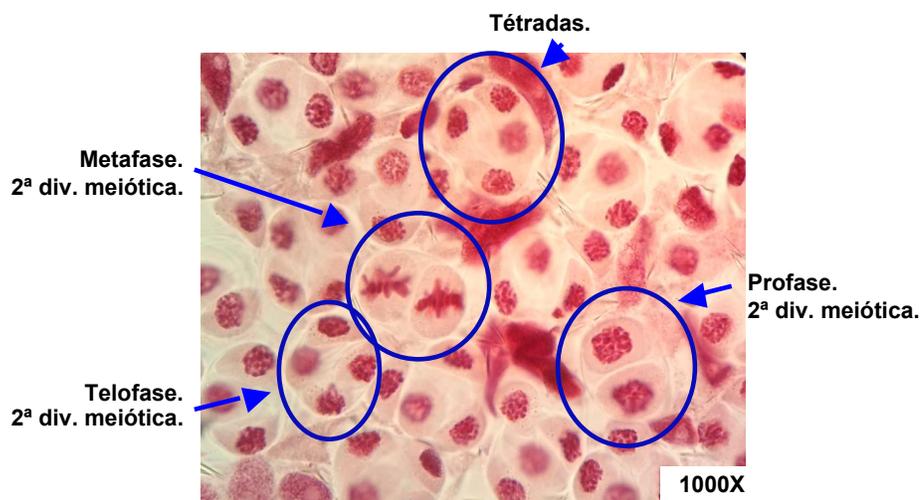
- Una vez separadas las anteras, con la punta de la jeringa abrir la antera y liberar las células gaméticas del saco y con la punta de la aguja esparcirlas en una pequeña área del portaobjetos.

B. Tinción de las células gaméticas

- Dejar secar el fijador de la muestra.
- Agregar a la muestra una gota de solución de acetorceína, colocar un cubreobjetos y reposar 5-10 min.
- Posteriormente colocar el portaobjetos con el cubreobjetos en una toallita de papel a modo de sándwich y presionar, para quitar el exceso de colorante.
- Observar al microscopio óptico con los objetivos de 10, 40 y 100 X. Al usar el objetivo de 100 X, no olvidar colocar una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos. Obtener fotos de las figuras meióticas.
- Realizar el conteo de células en varios campos observados para obtener el índice meiótico.

Resultados

- Hacer observaciones al microscopio óptico para encontrar células en diferentes etapas de la división meiótica, capturar imágenes e indicar características y aumento, como se muestra en el ejemplo a continuación.



Figuras meióticas en una muestra de *Gibasis geniculata*.

- Determinar el índice meiótico:

$$\text{Índice meiótico} = \frac{\text{Número de células en meiosis} \times 100}{\text{Número total de células contadas}}$$

Análisis de resultados

Nota: Recordar que los puntos que se dan a continuación son una base para realizar el análisis.

- Tipo de muestras y células donde se observa la meiosis.
- Índice meiótico encontrado.
- Explicar cuál es el significado de encontrar células con 2 núcleos o tétradas y número cromosómico en ellas.

Conclusión generada por el estudiante

Questionario previo

1. Esquematizar y describir brevemente qué es la meiosis y sus fases.
2. Mencionar las partes de la flor y resaltar las estructuras sexuales femeninas y masculinas.
3. Referente a la planta utilizada indicar el número de cromosomas que presenta en su fase diploide y haploide.
4. ¿Cuál es la función del fijador y cuál la del colorante empleado en esta práctica?
5. ¿En qué etapa de la meiosis será posible observar tétradas? Explicar.

Bibliografía

-  Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Biología Molecular de la célula. 5ª ed. Omega. España.
-  Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J y Bertoni GP. 2009. The world of the cell. Seventh Ed. The Benjamin/Cummings. USA.
-  Birchler JA, Han F. 2013. Meiotic behavior of small chromosomes in maize. *Front Plant Sci.* 17;4: 505.
-  De Robertis EMF y Hib J. 2011. Fundamentos de Biología Celular y Molecular. De Robertis. 4ª ed. El Ateneo. Argentina.
-  Karp G. 2009. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana de México. México.
-  Lodish HF, Berk A, Matsudaira P, Kaiser M, Krieger M, Scott MP, Zipursky SI y Darnell, JE. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2003. Bioquímica. 3ª ed. Addison Wesley. México.
-  Pareja ONM, Santacruz ONK, Ordoñez JHR, Lagos BTC. 2010. Comportamiento meiótico de diferentes especies de lulo, *Solanum sp.* *Acta Agronómica.* 59; 4:394-400.
-  Tiang CL, He Y, Pawlowski WP. 2012. Chromosome organization and dynamics during interphase, mitosis, and meiosis in plants. *Plant Physiol.* 158; 1:26-34.
-  Voet D. Fundamentos de Bioquímica. 2007. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Médica Panamericana. España.
-  Wijnker E, Schnittger A. 2013. Control of the meiotic cell division program in plants. *Plant Reprod.* 26; 3:143-58.

Estructura y Función Celular II

Se terminó de imprimir en noviembre de 2015,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina,
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600